



Inhibiteurs et modèles moléculaires de fibres amyloïdes ° et tau impliquées dans la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et caractérisation

Emilie Dufour

► To cite this version:

Emilie Dufour. Inhibiteurs et modèles moléculaires de fibres amyloïdes ° et tau impliquées dans la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et caractérisation. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV070 . tel-01062180

HAL Id: tel-01062180

<https://theses.hal.science/tel-01062180>

Submitted on 9 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Emilie DUFOUR

Thèse dirigée par **Julian GARCIA**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Inhibiteurs et modèles moléculaires de fibres amyloïdes beta et tau impliquées dans la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et caractérisation

Thèse soutenue publiquement le **13 mai 2013**
devant le jury composé de :

Mr. Philippe BELMONT

Professeur, Université Paris Descartes, Rapporteur

Mr. Ahcène BOUMENDJEL

Professeur, Université Joseph Fourier, Président

Mr. Julian GARCIA

Professeur, Université Joseph Fourier, Membre

Mr. Anthony ROMIEU

Maître de Conférences, Université de Rouen, Rapporteur



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Pascal Dumy, anciennement directeur du Département de Chimie Moléculaire et de l'équipe Ingénierie des Interactions Biomoléculaires, de m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis mon Master 1 et de m'avoir permis d'effectuer mon doctorat au sein de son équipe.

Je remercie également le Pr. Julian Garcia pour m'avoir offert mes deux stages de Master ainsi que la possibilité de réaliser ces travaux de thèse. J'ai beaucoup apprécié sa bonne humeur au quotidien. Je le remercie également de m'avoir accordé sa confiance dans mes travaux.

Je souhaite remercier les personnes qui ont jugé ce travail et ont formé le jury lors de ma soutenance :

- Pr. Philippe Belmont, Professeur à la Faculté des sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris
- Pr. AHCÈNE Boumendjel, Professeur au Département de Chimie Moléculaire de Grenoble
- Dr. Anthony Romieu, Maître de conférences au laboratoire COBRA dans l'équipe de Chimie Bio-Organique de Rouen

Je les remercie pour la pertinence de la discussion lors de la soutenance.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Sabine Chierici pour son aide précieuse lors de la rédaction de mon manuscrit. Je la remercie pour sa disponibilité, son soutien, la qualité de ses corrections et sa gentillesse. Ce fut un grand plaisir de travailler avec elle.

Je remercie le Dr. Lisa Moni qui a initié le projet autour de la dicétopipérazine. Merci Lisa pour tout ce que tu m'as appris, pour ta gentillesse et ta patience. Je te remercie aussi pour ton soutien même après ton départ.

Je remercie également l'équipe du Professeur Ghezzi qui a réalisé les travaux sur les souris. Je remercie Sandrine et Mitra pour avoir effectué le radiomarquage de mes composés. Je remercie également Marcelle et Angélique pour les expérimentations sur les souris ainsi que pour leur aide tout au long de mes travaux et de la rédaction de ce manuscrit. Merci Angélique pour ton soutien durant cette dernière année.

Je souhaite également remercier toute l'équipe I₂BM pour toutes ces années passées avec eux. Je remercie particulièrement le Dr. Didier Boturyn, actuellement chef de l'équipe, pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de ma thèse. Je tiens également remercier le Pr. Olivier Renaudet de m'avoir offert mon stage de Master 2 qui a conduit à deux publications. Merci Olivier et Nico pour la bonne humeur dégagée depuis le bureau en face de mon labo. Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Nathalie Berthet de m'avoir accueillie dans son bureau l'été dernier. Merci Nath pour tes conseils et ton soutien qui m'ont été très précieux. Je remercie également tous mes collègues thésards pour la bonne ambiance qui a régné tout au long de ses années. Merci tout d'abord à Myriam pour m'avoir si bien encadrée lors de mon stage de Master 1. Merci à Mathieu et Julien que j'ai rencontré lors de mon stage de Master 1 et qui resteront toujours de bons amis. Merci Julien pour ta patience, ton soutien et les apéros... Merci à Romaric et Isabelle, des amis hors pair avec lesquels j'ai poursuivi ma thèse. On peut dire que nous aurons tout partagé... Je remercie Romaric pour son soutien, son écoute et sa patience (petit tour au labo le week-end par exemple...). Ensuite sont arrivés Michaël et Morgane puis Baptiste et Adrien qui se sont très bien intégrés à notre petit groupe. Merci à Michaël mon compagnon de travail pour ton aide précieuse au labo et le partage des galères au quotidien. Merci à Morgane pour son aide du côté bio et pour partager le vin blanc avec moi à l'apéro. Merci à Adrien, mon « chouchou », pour sa bonne humeur et ses bonnes blagues. Je tiens également à remercier Christopher alias « Choupinet », qui a contribué au maintien de la solidarité au sein de notre groupe. Merci d'avoir amené autant de gaieté dans le labo. Je me souviendrai toujours des soirées au labo en ta compagnie... Je remercie également mes collègues post-doc. Merci en particulier à Nabil pour tous les bons moments passés ensemble, pour ton soutien dans les moments difficiles. Ton amitié a permis de rendre cette dernière année plus agréable. Je remercie également Michele, notre compagnon de bureau pour sa gentillesse. Je souhaite remercier les stagiaires de Licence et de Master qui ont contribué à ces travaux : Axel, Laetitia, Margot, Gabriella, Amélie et Déborah.

Je remercie mes amis de cours et de thèse Amélie, Sandrine et Alex pour toutes nos « soirées M2 ». Merci à Aurélie ma partenaire de Master et ma semi-colocataire de cette année pour son amitié qui demeure au fil des années. Je remercie aussi Damien Jouvenot pour son soutien et son aide, souvent apportés autour d'un bon apéro...

Je remercie également toute ma famille pour leur soutien, à qui je souhaite dédier mes travaux : mes parents Jacques et Claire, ma petite sœur adorée Marianne, mes grands parents Martial et Ginette, Marie-Françoise et Yves, Chantal et Clothilde, Sandrine, Doriane et Lionel, Valerian, Sophie et mon petit Sébastien chéri. Un grand merci à mes parents qui m'ont permis de faire de si longues études ainsi que pour leur gentillesse et

leur soutien. Je tiens à remercier particulièrement Marie-Françoise pour son aide précieuse lors de l'élaboration de ce manuscrit et qui m'a appris à dompter word. Je lui dédis donc ce manuscrit et ma soutenance à laquelle elle n'a malheureusement pas pu assister. Je remercie également Michel et Marie-Claire pour leur soutien et la bonne humeur qui régnait tous les dimanches...

Je souhaite également remercier tous mes amis pour leur soutien infaillible et tous les bons moments partagés. Je remercie particulièrement Clarisse qui a suivi tous les évènements de ma vie dans le détail ces cinq dernières années. Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Merci à Ombeline pour être là depuis si longtemps que je ne peux plus compter. Un grand merci à Nathalie pour son aide et son efficacité ces derniers mois. Merci de m'avoir remonté le moral pendant la rédaction, de m'avoir changé les idées avant la soutenance et pour toute son aide pour la préparation du buffet. Tu es incroyable ! Je remercie également tous les autres : Tiphaine, Alexandre (alias Poulet pour les intimes), Miwatt, Marion et Pierre, Solène, Seb et Coralie. Je vous adore tous. Je remercie Najib et Yann pour m'avoir si bien accueillie dans leur établissement autour d'un bon verre de vin. Je tiens également à remercier toute l'équipe du Martin's Café : Angel, Manu, mon Ju adoré, Jean-Michel, Laurent, Cathy et tous les autres. Merci pour votre accueil, votre soutien et votre amitié. Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu rencontrer dans cet établissement : Stéphane, Nico et Elo, Manu et Phil...

J'espère n'avoir oublié personne... Encore merci à tous !

SOMMAIRE

Avant-propos	1
Abréviations	2
Liste des acides aminés naturels.....	4
I. Introduction	6
I.1. La Maladie d'Alzheimer.....	6
I.1.1. Généralités sur les maladies à amyloses.....	6
I.1.2. Caractéristiques de la Maladie d'Alzheimer	9
I.1.3. Le peptide A β	11
I.1.3.1. Mécanisme de formation des fibres.....	11
I.1.3.2. Séquences et acides aminés impliqués dans la formation des fibres.....	14
I.1.3.3. Structure des fibres	17
I.1.4. La protéine tau	20
I.1.4.1. Mécanisme de formation des fibres.....	25
I.1.4.2. Domaines et structures impliqués dans la fibrillation de tau.....	26
I.1.5. Toxicité des fibres amyloïdes du peptide A β et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer	30
I.1.6. Diagnostic et traitement de la maladie d'Alzheimer	36
I.1.6.1. La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).....	36
I.1.6.2. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	39
I.1.6.3. Traitement de la maladie d'Alzheimer	43
I.2. Projet de recherche.....	48
I.3. Le châssis moléculaire dicétopiperazine (DCP)	52
I.3.1. Le cycle DCP dans les molécules bioactives.....	53
I.3.2. La DCP en tant que châssis moléculaire.....	54
I.3.2.1. Mimes de β -turn	55
I.3.2.2. Récepteurs à deux bras	58
I.3.3. Utilisation de la DCP en tant que navette pour passer la BHE	59
II. Chapitre 1 : Conception, synthèse et évaluation d'assemblages moléculaires ciblant les protéines à amyloses de la maladie d'Alzheimer	63

II.1. Etat de l'art sur les inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'Aβ₄₀ et de tau.....	63
II.1.1. Inhibiteurs peptidiques	63
II.1.1.1. Inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide A β ₄₀	63
II.1.1.2. Inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau.....	72
II.1.2. Inhibiteurs hétéroaromatiques.....	75
II.1.2.1. Inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'A β ₄₀	75
II.1.2.2. Inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau.....	83
II.1.3. Approches multimériques.....	92
II.2. Synthèse des inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide Aβ et de la protéine tau.....	94
II.2.1. Synthèse des DCP protégées.....	98
II.2.1.1. Stratégie de synthèse envisagée pour notre châssis DCP	98
II.2.1.2. Synthèse des D6C-Boc/2Alloc 11 et D3C-Boc/2Alloc 12.....	100
II.2.1.3. Variation de l'acide aminé couplé sur la lysine N α alkylée	102
II.2.1.4. Variation des groupes protecteurs	103
II.2.1.5. Conclusion.....	105
II.2.2. Synthèse des inhibiteurs peptidiques.....	105
II.2.2.1. Couplage des séquences peptidiques par leurs extrémités C-terminales (lien amide).....	107
II.2.2.2. Couplage des séquences peptidiques par leurs extrémités N-terminales (lien éther d'oxime)	110
II.2.3. Synthèse des inhibiteurs hétéroaromatiques.....	114
II.2.3.1. Assemblages présentant les dérivés du curcumin.....	116
II.2.3.2. Assemblages présentant un dérivé ATPZ	121
II.2.4. Synthèse d'un inhibiteur « mixte »	122
II.3. Synthèse des assemblages pour le radiomarquage au technetium	124
II.3.1. Synthèse des molécules contrôles.....	125
II.3.2. Synthèse des assemblages présentant des modules de reconnaissance.....	128
II.3.2.1. Assemblages peptidiques	128
II.3.2.2. Assemblages présentant l'ATPZ.....	131
II.4. Evaluation biologique <i>in vitro</i> des inhibiteurs.....	132
II.4.1. Inhibiteurs peptidiques	135
II.4.1.1. Châssis dicétopiperazine.....	135

II.4.1.2.	Peptides couplés par leur extrémité C-terminale.....	136
II.4.1.3.	Peptides liés sur la D6C par leur extrémité N-terminale	137
II.4.2.	Inhibiteurs hétéroaromatiques.....	139
II.4.2.1.	Assemblages curcumin	139
II.4.2.2.	Assemblages ATPZ	142
II.4.2.3.	Inhibiteur mixte	143
II.4.2.4.	Synthèse des résultats	144
II.5.	Evaluation biologique <i>in vivo</i> des assemblages radiomarqués au ^{99m}Tc.....	147
II.5.1.	Etat de l'art sur les outils pour l'étude des plaques amyloïdes et des DNF <i>in vivo</i>	147
II.5.1.1.	Radiotraceurs référencés pour les plaques amyloïdes et les DNF	147
II.5.1.2.	Modèles de souris.....	150
II.5.2.	Radiomarquage des composés	152
II.5.2.1.	Molécules contrôles.....	153
II.5.2.2.	DCP présentant des séquences peptidiques	154
II.5.2.3.	DCP présentant l'ATPZ.....	155
II.5.3.	Biodistribution chez les souris sauvages et 3xTg	156
II.5.3.1.	DCP contrôles.....	156
II.5.3.2.	Châssis D3C présentant des motifs de reconnaissance.....	158
II.5.3.3.	Synthèse des résultats et conclusion.....	160
II.6.	Conclusion	161
III.	Chapitre 2 : Conception de mimes de la protéine tau pour l'étude de sa fibrillation <i>in vitro</i>	165
III.1.	Etat de l'art	166
III.1.1.	Fibrillation de la protéine tau	166
III.1.1.1.	Fibrillation de la protéine tau <i>in vitro</i>	166
III.1.1.2.	Structure des fibres de tau	172
III.2.	Conception des mimes de tau	174
III.2.1.	Identification des séquences par modélisation moléculaire	174
III.2.2.	Stratégie de synthèse.....	176
III.2.3.	Synthèse des mimes.....	177
III.2.3.1.	Synthèse des châssis D6C	177
III.2.3.2.	Synthèse des synthons peptidiques	178

III.2.3.3.	Synthèse des assemblages D6C	179
III.3.	Caractérisation des structures formées	180
III.3.1.	Principe des tests et méthodes de caractérisation.....	181
III.3.2.	Test des conditions de fibrillation.....	182
III.3.3.	Second test de fibrillation et d'inhibition	188
III.3.4.	Etude par microscopie à force atomique (AFM).....	192
III.3.5.	Synthèse des résultats et conclusion	196
IV.	Conclusion.....	199
V.	Partie Expérimentale	202
V.1.	Protocoles de synthèse	202
V.1.1.	Materials and instruments.....	202
V.1.1.1.	Reagents	202
V.1.1.2.	Instruments.....	202
V.1.2.	Synthesis protocols	203
V.2.	Expériences d'inhibition <i>in vitro</i>	255
V.2.1.	Preparation of synthetic A β ₄₀ peptide	255
V.2.2.	Preparation of inhibitor stock solutions	255
V.2.3.	Fibril formation measurement of A β ₄₀	255
V.2.4.	Atomic Force Microscopy (AFM).....	255
V.3.	Caractérisation des mimes de tau	256
V.3.1.	Circular Dichroism spectroscopy (CD).....	256
V.3.2.	Binding of ThT: fluorescence measurements	256
V.3.3.	Aggregation assays: fluorescence measurements.....	256
V.3.4.	Atomic Force Microscopy (AFM).....	257
VI.	Bibliographie	258

TABLEAUX

Tabl. 1-	Classification des amyloses.....	7
Tabl. 2-	Inclusions intracellulaires de type amyloïde.....	8
Tabl. 3-	Exemples d'espèces oligomériques de l'A β décrites dans la littérature	13
Tabl. 4-	Cahier des charges pour la conception d'assemblages ciblant la fibrillogénèse du peptide A β ₄₀ et de la protéine tau	51
Tabl. 5-	Exemples de polyphénols testés sur la fibrillation des peptides A β	77
Tabl. 6-	Inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau.....	84
Tabl. 7-	Activités inhibitrices des assemblages basés sur le cyclodécapeptide.....	94
Tabl. 8-	Résultats obtenus avec les châssis sans motifs de reconnaissance	135
Tabl. 9-	Résultats obtenus avec les D6C présentant les motifs KLVFFA liés par leurs C-ter.....	136
Tabl. 10-	Résultats obtenus avec les D6C présentant le motif KLVFFA lié par son extrémité N-terminale.....	138
Tabl. 11-	Résultats obtenus avec les D6C présentant le motif VQIVYK lié par son extrémité N-terminale.....	138
Tabl. 12-	Résultats obtenus avec les D6C 60 et 62 présentant des motifs CurcPyr	140
Tabl. 13-	Résultats obtenus avec les D6C présentant des motifs CurcPyr 64 et 67	140
Tabl. 14-	Résultats obtenus avec les D6C 65 et 68 présentant des motifs curcumin.....	141
Tabl. 15-	Résultats obtenus avec les D6C présentant l'ATPZ	142
Tabl. 16-	Marqueurs des peptides A β en imagerie TEP.....	148
Tabl. 17-	Etude des facteurs influençant la fibrillation de tau et de ses mutants (K18, K19 et K18 Δ K280).....	168
Tabl. 18-	Résultats obtenus pour les quatre conditions de fibrillation	183
Tabl. 19-	Résultats obtenus pour le second test de suivi par fluorescence (ThS)	190

FIGURES

Fig. 1.	Structures du Rouge Congo et de la Thioflavine T.....	8
Fig. 2.	Coupe d'un cortex cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer possédant des plaques séniles (plaques) et des dégénérescences neurofibrillaires (tangles) ⁹	9
Fig. 3.	Représentation des acteurs clés impliqués dans la maladie d'Alzheimer ¹⁴ , dont des plaques amyloïdes et des DNF (neurofibrillary tangles).....	10
Fig. 4.	Mécanisme de nucléation de la fibrillation	11
Fig. 5.	Représentation schématique des différentes voies conduisant à la fibrillation du peptide A β ^{2b}	12
Fig. 6.	Séquence du peptide A β ₄₂	14
Fig. 7.	Modèle de l'interaction entre les chaînes latérales du peptide A β ₄₀ ³⁶	16

<i>Fig. 8.</i>	Caractéristiques des fibres d'A β (A) Motif de diffraction aux rayons X ⁴¹ (B) Reconstruction d'un protofilament ⁴¹ (C) Microscopie électronique de l'A β ₄₀ ³⁷ (D) AFM du peptide A β ₄₀	18
<i>Fig. 9.</i>	Modèle structurale des feuillets β croisés du peptide A β (a) Modèle ruban (b) Modèle atomique (vert : hydrophobe, violet : polaire, rouge : chargé négativement, bleu : chargé positivement) ³⁷	19
<i>Fig. 10.</i>	Modèle structural (rubans) du protofilament du peptide A β ₄₀ selon une symétrie C _{2z} ou C _{2x} ³⁸	19
<i>Fig. 11.</i>	Modèles expérimentaux du repliement des peptides A β ₄₀ ³⁹ (A) Modèle en rubans des fibres enroulées (symétrie C ₃) (B) Modèle atomique des fibres enroulées vu par dessous (vert : hydrophobe, magenta : polaire, rouge : chargé négativement, bleu : chargé positivement) (C) Comparaison des fibres torsadées (en haut) et des fibres en rubans striés (en bas) du peptide A β ₄₀ observées en microscopie électronique (D) Modèle atomique des fibres striées obtenu par Petkova et al ^{37,38}	20
<i>Fig. 12.</i>	La protéine tau : (A) Séquence ⁴⁴ (bleu : résidus basiques chargés positivement, vert : résidus polaires non chargés, marron : résidus non polaires, rouge : résidus acides chargés négativement) (B) Représentation schématique des différents domaines	21
<i>Fig. 13.</i>	Schéma de l'expression des six isoformes de la protéine tau ⁴²	22
<i>Fig. 14.</i>	Mécanisme de nucléation proposé par Friedhoff et al ⁵⁹	25
<i>Fig. 15.</i>	Structure des mutants de la protéine tau	28
<i>Fig. 16.</i>	Mécanisme de régulation de la fibrillation de la protéine tau par ses extrémités C- et N-terminales ⁷⁷ (MTBR = Microtubules Binding Region)	30
<i>Fig. 17.</i>	Les trois modes d'interaction possibles tau/A β ⁷⁹ : a) L'A β induit la pathologie de tau b) La toxicité de tau induit la toxicité de l'A β c) Effet synergique de tau et A β	34
<i>Fig. 18.</i>	Hypothèse axée sur la protéine tau de la maladie d'Alzheimer ⁷⁹	36
<i>Fig. 19.</i>	Représentation schématique de la BHE localisée au niveau des capillaires cérébraux ¹⁰⁴	37
<i>Fig. 20.</i>	La BHE est une barrière physique et métabolique ¹⁰⁴	38
<i>Fig. 21.</i>	Structures des composés commerciaux pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.....	44
<i>Fig. 22.</i>	Structures de l'épothilone	45
<i>Fig. 23.</i>	Schéma des essais cliniques en cours en 2010 (*= essais stoppés) ¹²⁴	48
<i>Fig. 24.</i>	Châssis moléculaires : (A) Dicétopiperazine (B) Cyclodécapeptide.....	49
<i>Fig. 25.</i>	Structure d'une des DCP utilisée pour notre étude.....	52
<i>Fig. 26.</i>	Exemples de molécules bioactives possédant un cycle DCP	53
<i>Fig. 27.</i>	Exemples de molécules neuroprotectrices possédant un cycle DCP	54
<i>Fig. 28.</i>	Grandes classes de mimes de β -turn ¹⁴⁶	55
<i>Fig. 29.</i>	Mimes de β -turn internes basés sur la DCP ^{149,150}	56
<i>Fig. 30.</i>	Mimes de β -hairpin basés sur la DCP ¹⁴⁶	56
<i>Fig. 31.</i>	B-turn externe induit par la DCP : exemple du peptide NPNA ¹⁴⁶	57
<i>Fig. 32.</i>	β -hairpin induit par la DCP : exemple du peptide RGD ¹⁴⁶	58

Fig. 33.	Châssis DCP pour la synthèse de récepteurs à deux bras.....	59
Fig. 34.	Utilisation de la DCP en tant que transporteur pour passer la BHE	60
Fig. 35.	Structures des peptides testés par Gordon et <i>al</i> ¹⁷⁰	68
Fig. 36.	Inhibiteurs possédant des acides aminés α,α -disubstitués ¹⁷⁶	69
Fig. 37.	Structure du Trim-LPFFD.....	72
Fig. 38.	Structure des macrocycles inhibiteurs de la fibrillation du peptide Ac-PHF6 ¹⁸³	73
Fig. 39.	Mécanisme proposé pour la formation des fibres d'Ac-PHF6 (à gauche) et pour son inhibition par les macrocycles (à droite) ¹⁸³	74
Fig. 40.	Exemples de colorants inhibiteurs de la fibrillation du peptide A β	76
Fig. 41.	Exemples de phénothiazines inhibant la fibrillation du peptide A β	82
Fig. 42.	Exemples d'une porphyrine et d'un colorant cyanine inhibant la fibrillation du peptide A β	82
Fig. 43.	Structures du tamiprosate et du <i>scyllo</i> -inositol.....	83
Fig. 44.	Structure générale des ATPZ	88
Fig. 45.	Structure générale des rhodanines	89
Fig. 46.	Structure des phénylthiazolyldiazides.....	90
Fig. 47.	Inhibiteurs multimériques de la fibrillogénèse de l'A β ₄₀ basés sur le châssis cyclodécapeptide ¹³⁰	93
Fig. 48.	Synthèse d'inhibiteurs à partir du châssis moléculaire dicétopiperazine (DCP)	95
Fig. 49.	Composés hétérocycliques alcynes	97
Fig. 50.	Rétro-synthèse générale de nos châssis DCP	98
Fig. 51.	Synthèses de l'unité lysine B.....	99
Fig. 52.	Synthèse des D6C-Boc/2Alloc 11 et D6C-Boc/2Alloc 12.....	100
Fig. 53.	Schéma de synthèse des D6C-Boc/Alloc/Dde 15 et D3C-Boc/2Alloc 16	102
Fig. 54.	Schéma de synthèse de la D6C-Alloc/2Boc 22	103
Fig. 55.	Schéma de synthèse de la D6C-Boc/2Dde 28.....	104
Fig. 56.	Schéma de synthèse général des inhibiteurs peptidiques	106
Fig. 57.	Formation du lien éther d'oxime	106
Fig. 58.	Synthèse des peptides KLVFFA 29 et (Boc) ₂ KLVFFA 30.....	108
Fig. 59.	Synthèse des DCP présentant les motifs KLVFFA liés par leur C-terminal.....	109
Fig. 60.	Synthèse du peptide aldéhyde OHC-KLVFFA 38.....	110
Fig. 61.	Synthèse des peptides VQIVYK 39 et 41.....	111
Fig. 62.	Synthèse du NHS-Aoa-Acm 43.....	111
Fig. 63.	Synthèse des D6C présentant un motif peptidique.....	112
Fig. 64.	Synthèse des D6C présentant deux motifs peptidiques.....	113
Fig. 65.	Synthèse des D6C-3KLVFFA 52 et D6C-3VQIVYK 53	114
Fig. 66.	Formation du lien 1,4-triazole par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I)	114

Fig. 67.	Schéma général des assemblages présentant des composés hétéroaromatiques.....	116
Fig. 68.	Synthèse du curcumin pyrazole alcyne 56.....	117
Fig. 69.	Synthèse du curcumin alcyne 57	118
Fig. 70.	Réaction de diazotransfert	118
Fig. 71.	Synthèse des D6C présentant un ou deux motifs curcumin pyrazole	119
Fig. 72.	Synthèse des D6C présentant un motif curcumin	120
Fig. 73.	Synthèse des D6C présentant deux motifs curcumin	121
Fig. 74.	Synthèse de l'ATPZ alcyne 69	121
Fig. 75.	Synthèse des D6C-ATPZ/2NH ₂ 70 et D6C-NH ₂ /2ATPZ 71	122
Fig. 76.	Synthèse de la DCP6C-Curc/2KLVFFA 75	123
Fig. 77.	Structure des assemblages pour le radiomarquage au ^{99m} Tc	125
Fig. 78.	Schéma des DCP contrôles radiomarquées.....	126
Fig. 79.	Synthèse des DCP contrôles	127
Fig. 80.	Synthèse des peptides témoins 82 et 83.....	127
Fig. 81.	Synthèse du peptide 84	128
Fig. 82.	Synthèse des D6C- et D3C-His/2KYVIQV 86 et 87.....	129
Fig. 83.	Synthèse des D3C-His/KLVFFA 89 et D3C-His/VQIVYK 90	130
Fig. 84.	Synthèse des D3C-His/2KLVFFA 92 et D3C-His/2VQIVYK 93	131
Fig. 85.	Synthèse des D3C-His/ATPZ 94 et de la D3C-His/2ATPZ 95	132
Fig. 86.	Fibrillation <i>in vitro</i> du peptide Aβ ₄₀ : expérience de nucléation sans inhibiteur (bleu) ou avec inhibiteur (rouge)	133
Fig. 87.	Principe du test d'inhibition de la fibrillation du peptide Aβ ₄₀ suivi par émission de fluorescence de la ThT	134
Fig. 88.	Evolution de la fluorescence en fonction du temps avec la D6C-Alloc/2Boc 22	135
Fig. 89.	Suivi de la fluorescence au cours du temps avec la D6C- NH ₂ /AFFVLK 34	136
Fig. 90.	A gauche : évolution de la fluorescence au cours du temps avec la D6C-NH ₂ /2KLVFFA 49, A droite : Images du peptide Aβ ₄₀ par AFM sans (haut) ou avec 10 μM de D6C 49 (bas) après 8 jours d'incubation à 37 °C	137
Fig. 91.	Evolution de la fluorescence de la ThT au cours du temps avec la D6C-Boc/2CurcPyr 62	139
Fig. 92.	A gauche : évolution de la fluorescence au cours du temps avec la D6C-NH ₂ /2Curc 68, A droite: Images du peptide Aβ ₄₀ par AFM sans (haut) ou avec 10 μM de D6C 68 (bas) après 8 jours d'incubation à 37 °C	141
Fig. 93.	Evolution de la fluorescence au cours du temps en présence de la D6C 71	142
Fig. 94.	Evolution de la fluorescence en fonction du temps avec la D6C 75.....	143
Fig. 95.	Pourcentages d'inhibition de la fibrillation du peptide Aβ ₄₀ obtenus avec les assemblages présentant des motifs peptidiques	144
Fig. 96.	Pourcentages d'inhibition de la fibrillation du peptide Aβ ₄₀ obtenus avec les assemblages présentant des molécules hétéroaromatiques.....	146

Fig. 97. Marqueurs des DNF pour l'imagerie PET.....	149
Fig. 98. Immuno-histochimie visualisant les plaques amyloïdes et les DNF chez les souris 3xTg (réalisée par l'équipe du Pr. Ghezzi).....	152
Fig. 99. Complexation du ^{99m} Tc par l'histidine avec le kit Isolink®	153
Fig. 100. Chromatogrammes obtenus pour le radiomarquage de la D6C 78.....	153
Fig. 101. Exemples de chromatogrammes du radiomarquage du peptide HVQIVYK 83	154
Fig. 102. Chromatogrammes obtenus pour le radiomarquage de la D6C 87.....	154
Fig. 103. Radiomarquage des D3C 89 et 90 : superposition des profils CLHP immédiatement après radiomarquage et après 6h	155
Fig. 104. Radiomarquage de la D3C-His/ATPZ 94.....	155
Fig. 105. Biodistribution cérébrale des radiotraceurs 78 et 79 chez les souris sauvages à des différents temps de sacrifices (temps <i>post</i> injection en minutes). **p<0,01, *p<0,05	157
Fig. 106. Autoradiographie des radiotraceurs 78 et 79 chez les souris sauvages (WT) et 3xTg	158
Fig. 107. Biodistribution cérébrale de la D3C-His/VQIVYK 90 chez les souris sauvages (WT) ou 3xTg (* p<0.05) aux temps 10 et 45 minutes	159
Fig. 108. Comparaison des biodistributions des D3C-His/2Alloc 79 et D3C-His/VQIVYK 90 chez les souris sauvages dans le cerveau.....	159
Fig. 109. Autoradiographie cérébrale de la D3C 90 chez la souris au temps 10 min.....	160
Fig. 110. Structures des modèles de fibres du peptide Aβ ₄₀ ¹²⁸ (a) 4Lin (b) 2Lin (c) 4Loop (d) 2Loop	166
Fig. 111. Structure des mutants de la protéine tau	167
Fig. 112. Formation de dimères de tau lors de la nucléation.....	170
Fig. 113. Modèle de liaison de l'héparine avec la protéine tau ²⁵⁷ (Domaine de projection N-terminal en bleu, domaine de liaison aux microtubules en jaune et extrémité C-terminale en rouge. En gras : tau en présence d'héparine, en transparent sans héparine).....	171
Fig. 114. Brins β attribués dans le motif R3 ²⁶⁰ (δ= déplacement chimique)	173
Fig. 115. Arrangements structuraux proposés pour le feuillet β3 de la protéine tau ²⁶⁰	174
Fig. 116. Schéma des brins peptidiques sélectionnés.....	175
Fig. 117. Stratégie de synthèse	176
Fig. 118. Schéma de synthèse de la DCP bis-aldéhyde 98.....	178
Fig. 119. Schéma de synthèse du peptide linR4.....	179
Fig. 120. Schéma de synthèse du peptide linR3.....	179
Fig. 121. Schéma de synthèse de la D6C-2R4.....	180
Fig. 122. Schéma de synthèse de la D6C-2R3.....	180
Fig. 123. Principe du test sur microplaque suivi par le déplacement d'émission de fluorescence de la thioflavine	181
Fig. 124. Evolution de la fluorescence (ThT) au cours du temps pour le peptide linR3.....	183
Fig. 125. Dichroïsme circulaire (CD pour circular dichroïsme) des peptides linR3 et linR4	184

<i>Fig. 126.</i> Evolution de la fluorescence (ThT) au cours du temps pour la D6C-2R3	185
<i>Fig. 127.</i> Dichroïsme circulaire des composés D6C-2R3 et D6C-2R4	187
<i>Fig. 128.</i> Suivi par émission de fluorescence de la ThT des structures formées par linR3 et D6C-2R3 en absence (cond 2) ou en présence (cond 4) d'héparine	188
<i>Fig. 129.</i> Suivi de la fluorescence de linR3 et D6C-2R3 avec la ThT ou la ThS (en présence d'héparine).....	189
<i>Fig. 130.</i> Test de fibrillation et d'inhibition suivi par fluorescence (ThS) avec linR3.....	191
<i>Fig. 131.</i> Test de fibrillation et d'inhibition suivi par fluorescence (ThS) avec D6C-2R3.....	191
<i>Fig. 132.</i> Fibres de l'isoforme htau40 observées en AFM après 7 jours d'incubation dans le tampon PBS (pH 7,4), en présence d'héparine et de DTT à 37 °C	193
<i>Fig. 133.</i> Fibres formées par le peptide linR3 observées en AFM après 7 et 14 jours d'incubation dans le tampon PBS (pH 7,4), en présence d'héparine à 37 °C.....	194
<i>Fig. 134.</i> Structures formées par la D6C-2R3 observées en AFM après 7 jours d'incubation dans le tampon PBS, en présence d'héparine à 37 °C.....	195

Avant-propos

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Julian Garcia au sein du laboratoire « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », CNRS UMR 5250, Département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Communication orale à un congrès :

Dufour E., Moni L., Dumy P., and Garcia J., Synthèse et évaluation biologique d'assemblages moléculaires ciblant la protéine tau et l'amyloïde bêta. *14^{ème} REcontres en Chimie Organique Biologique (RECOB 14)*, **16-20 Mars 2012**, Aussois, France.

Communications par poster à des congrès :

Dufour E., Moni L., and Garcia J., Virgogne A., Martin S., Ahmadi M., Perret P., Moulin M., Fagret D. et Ghezzi C, Synthèse et évaluation biologique de radiomarqueurs ciblant les protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer. *2^{èmes} Journées Scientifiques du Médicament « Biomolécules, Vieillissement et Transfert génétique »*, **14-15 Juin 2012**, La Tronche, France.

Dufour E., Moni L., Dumy P., and Garcia J., Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs de la fibrillogénèse de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer (tau et amyloïde bêta). *Journée Rhône-Alpes des Biomolécules*, **1^{er} Juin 2012**, Saint-Martin d'Hères, France.

Dufour E., Moni L., Dumy P., and Garcia J., Synthèse et évaluation biologique de marqueurs de la protéine Tau impliquée dans la maladie d'Alzheimer. *Conférence du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP) 17^{ème} congrès*, **30 Janvier-4 Février 2011**, Aussois, France.

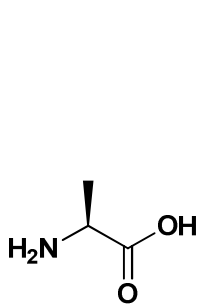
Dufour E., Ouberaï, M., Chierici, S., Deumenynck, M., Dumy, P., and Garcia, J. Synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs multi-cibles de la maladie d'Alzheimer. *Journée Rhône-Alpes des Biomolécules*, **3 Juin 2010**, Saint-Martin d'Hères, France.

Abréviations

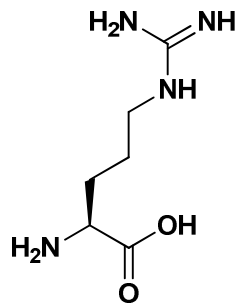
Aβ	Peptide β amyloïde, Aβ ₄₀ /Aβ ₄₂
Ac	Acétyl
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
Acm	Acétamidométhyle
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
Alloc	Allyloxy-carbonyl
APP	Amyloid Precursor Protein
ADDLs	Aβ derived diffusible ligands
AFM	Atomic Force Microscopy
APP	Amyloid Precursor Protein
ARN	Acide Ribonucléique
ATPZ	Aminothienopyridazine
BuChE	Butylcholinestérase
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
Boc	<i>tert</i> -butyloxy-carbonyl
Boc₂O	Di- <i>tert</i> -Butyl Dicarbonate
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Circular Dichroism
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CuAAC	Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
Curc	Curcumin
CurcPyr	Curcumin Pyrazole
DC₅₀	Concentration pour désassembler 50% des fibres amyloïdes
DI/g	Dose Injectée par gramme
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCP	Dicétopiperazine
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)éthyle
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNF	Dégénérescences Neurofibrillaires
DTT	Dithiothréitol
EDT	Ethandithiol
éq.	Equivalent molaire
ESI	Electrospray Ionisation
Et₂O	Ether diéthylique
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl
GAGs	Glycosaminoglycanes
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphate
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
htau	human tau protein

IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
IC₅₀	Concentration inhibant de 50% un paramètre
LCR	Liquide Céphalo-rachidien
MeOH	Méthanol
MET	Microscopy electron transmission
MTBR	Microtubule Binding Region
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMDA	<i>N</i> -Méthyl-D-aspartate
<i>o</i>-Ns	<i>ortho</i> -Nosyle
PBS	Phosphate Buffer Saline
PHF	Paired Helical Filaments
PIB	Pittsburg Compound B
ppm	Partie par million
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
RP-HPLC	Reverse Phase—High Performance Liquid Chromatography
RT	Retention Time
RX	Rayon X
SM	Spectrométrie de Masse
SNC	Système Nerveux Central
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
SS-NMR	Solide State Nuclear Magnetic Resonance
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TEMP	Tomographie par Emission Monophotonique
<i>t</i>Bu	<i>Tertio</i> -butyl
TFA	Acide trifluoroacétique
TFFH	Fluoro-N,N,N',N'-tetraméthylformamidinium hexafluorophosphate
Tg	Transgénique
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	tris(hydroxy-propyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methylamine)
ThS	Thioflavine s
ThT	Thioflavine T
TIS	Triisopropylsilane
TMS	Triméthylsilyle
TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
Tpn P	Tampon P (50 mM Phosphate, pH 7,4, 100 mM NaCl)
Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)
UV	Ultraviolet
WT	Wild Type

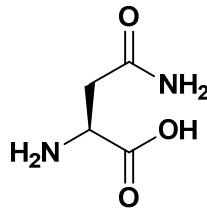
Liste des acides aminés naturels



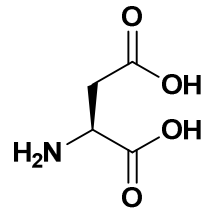
L-Alanine
(Ala / A)



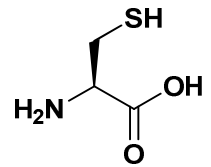
L-Arginine
(Arg / R)



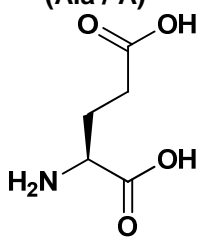
L-Asparagine
(Asn / N)



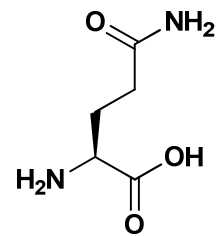
Acide L-aspartique
(Asp / D)



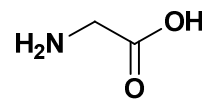
L-Cystéine
(Cys / C)



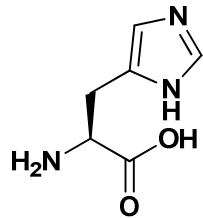
Acide L-glutamique
(Glu / E)



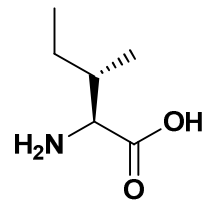
L-Glutamine
(Gln / Q)



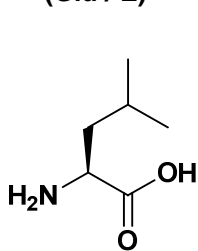
Glycine
(Gly / G)



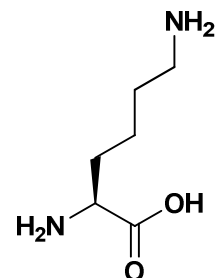
L-Histidine
(His / H)



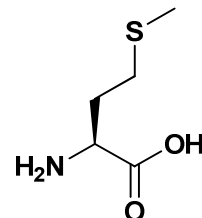
L-Isoleucine
(Ile / I)



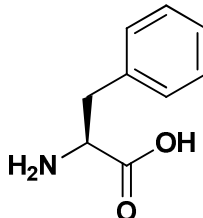
L-Leucine
(Leu / L)



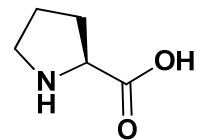
L-Lysine
(Lys / K)



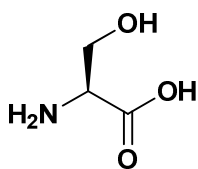
L-Méthionine
(Met / M)



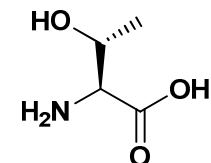
L-Phénylalanine
(Phe / F)



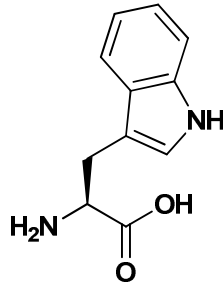
L-Proline
(Pro / P)



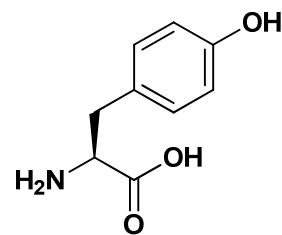
L-Sérine
(Ser / S)



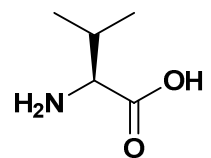
L-Thréonine
(Thr / T)



L-Tryptophane
(Trp / W)



L-Tyrosine
(Tyr / Y)



L-Valine
(Val / V)

I. Introduction

I.1. La Maladie d'Alzheimer

I.1.1. Généralités sur les maladies à amyloses

L'amylose est une pathologie qui se définit par un repliement anormal des protéines les conduisant à leur agrégation sous formes de fibres dans les conditions physiologiques (pH, force ionique). En effet, l'accumulation de ces protéines sous forme de fibres conduit à la formation de dépôts amyloïdes¹. Historiquement, la dénomination amyloïde a été attribuée par Rudolph Virchow au XIX^e siècle. Cet anatomopathologiste a décrit la coloration bleue de ces dépôts par l'iode en présence d'acide sulfurique similaire à celle observée pour l'amidon¹. Ce n'est que récemment que les méthodes d'analyse biochimique ont permis la découverte des diverses protéines impliquées dans ce processus biologique.

Les précurseurs de ces fibres sont des protéines circulantes parfaitement solubles, entières ou tronquées. Le mécanisme exact entraînant leur changement de conformation pour conduire à la formation de fibres est encore non élucidé. Les différentes protéines amyloïdes ainsi que leurs précurseurs ne possèdent pas de séquences, de propriétés structurales ou fonctionnelles qui leur soient communes¹. La classification de ces protéines a été établie par le comité de l'ISA (International Society of Amyloidosis) et comprend une trentaine de protéines amyloïdes chez l'homme (Tabl. 1-) dont neuf se retrouvent chez l'animal². Il n'y a pas de physiopathologie générale pour les maladies à amyloses, ce sont des pathologies différentes ayant en commun la formation finale de l'amylose mais seulement une structure commune dans la formation.

1.(a) Grateau, G.; Verine, J.; Delpech, M.; Ries, M., Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines. *Med. Sci. (Paris)* **2005**, 21 (6-7), 627-633; (b) Buxbaum, J. N.; Linke, R. P., A Molecular History of the Amyloidoses. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421 (2-3), 142-159.

2.(a) Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.-i.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermarck, P., Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* **2012**, 19 (4), 167-170; (b) Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem* **2006**, 75 (1), 333-366.

Tabl. 1- Classification des amyloses

Pathologies	Peptides ou protéines amyloïdes	Nombre de résidus	Structure à l'état natif	Systémique (S), localisée (L) ou probablement localisée (L ?)
Maladie d'Alzheimer	Amyloïde β (A β)	40 ou 42	Non structuré	L (système nerveux central)
Encéphalopathie spongiformes (exemple : Creutzfeldt-Jacob)	Prion (PrP)	253	Partiellement structurée en hélice α	L (système nerveux central)
Diabète de type II	Amyline ou Islet Amyloid Polypeptide (IAPP)	37	Non structurée	L (îlots de Langerhans, insulinome)
Amylose AL	Chaîne légère de l'immunoglobuline	≈ 90	Feuillet β	S (Primaire), L (associée au myélome)
Amylose de l'hémodialyse	$\beta 2$ -microglobuline	99	Feuillet β	S (associée à l'hémodialyse), (L ? articulations)
Amylose systémique sénile	Transthyrétine (TTR)	127	Feuillet β	S (L ? tendons)
Amylose secondaire (fièvre méditerranéenne)	Protéine sérum amyloïde A (AA)	76-104	Hélice α	S

Les amyloses sont divisées en deux catégories, amyloses localisées lorsqu'elles se situent au niveau d'un seul organe ou tissu et amyloses systémiques lorsqu'elles ont lieu dans de multiples tissus ou organes². Parmi ces pathologies, certaines sont sporadiques, d'autres héréditaires ou transmissibles.

Il est actuellement admis que les fibres amyloïdes doivent posséder les propriétés physico-chimiques suivantes² :

- Une biréfringence verte est observée au microscope à lumière polarisée lorsque la substance amyloïde est marquée au Rouge Congo³. Le maximum d'absorption de ce colorant est déplacé de 500 nm vers 530-540 nm. Cette coloration est spécifique aux dépôts amyloïdes. Les fibres amyloïdes peuvent également se lier à la thioflavine T (ThT) et cette liaison entraîne un déplacement de l'excitation de fluorescence de 385 à 450 nm et de l'émission de fluorescence de 445 à 480 nm⁴.

3.(a) Puchtler, H.; Sweat, F.; Levine, M., On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **1962**, 10 (3), 355-364; (b) Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P., [19] Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 285-305.

4.(a) Levine, H., Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, 2 (3), 404-410; (b) LeVine Iii, H., [18] Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 274-284.

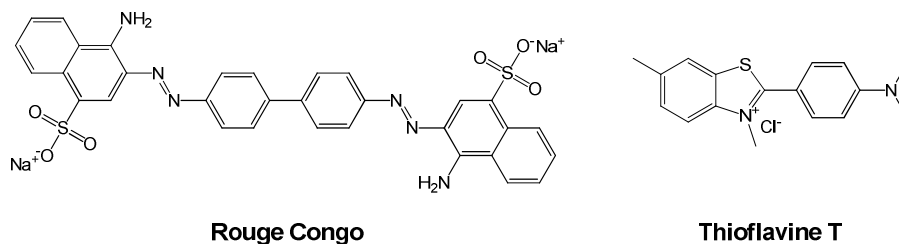


Fig. 1. Structures du Rouge Congo et de la Thioflavine T

- En microscopie à transmission électronique (MET) ou à force atomique (AFM), les fibres sont rectilignes, enchevêtrées mais non ramifiées, et possèdent un diamètre d'environ 10 nm^{5,6}.
- Les fibres amyloïdes sont caractérisées par un motif commun en diffraction par rayons X : elles présentent un motif en feuillets β croisés^{6,7}. Ce motif correspond à des brins β disposés perpendiculairement (ou presque) à l'axe de la fibre, liés par des liaisons hydrogènes intermoléculaires s'étendant parallèlement à l'axe de la fibre.

Les dépôts ou plaques amyloïdes se retrouvent principalement dans les espaces extracellulaires des organes et tissus. Récemment, des inclusions intracellulaires dites de type amyloïde ont été identifiées (Tabl. 2-)². Parmi celles-ci, les inclusions de tau, impliquées dans la maladie d'Alzheimer, sont les seules à présenter toutes les caractéristiques des fibres amyloïdes citées ci-dessus.

Tabl. 2- Inclusions intracellulaires de type amyloïde

Nom de l'inclusion	Site	Nature de la protéine	Nombre de résidus	Structure à l'état natif	Exemples de maladies associées
Corps de Lewy	Neurones	α -synucléine	140	Non structurée	Maladie de Parkinson
Corps de Huntington	Neurones	Huntingtine polyglutamate étendue	3 144	Non structurée	Maladie de Huntington
Dégénérescences neurofibrillaires	Neurones	tau	352-441	Non structurée	Maladie d'Alzheimer

5.(a) Cohen, A. S.; Calkins, E., Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* **1959**, 183 (4669), 1202-1203; (b) Shirahama, T.; Cohen, A. S., High-Resolution Electron Microscopic Analysis of the Amyloid Fibril. *J. Cell Biol* **1967**, 33 (3), 679-708.

6.(a) Sunde, M.; Blake, C., The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. In *Adv. Protein Chem.*, Frederic M. Richards, D. S. E.; Peter, S. K., Eds. Academic Press: 1997; Vol. Volume 50, pp 123-159; (b) Makin, O. S.; Serpell, L. C., Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **2005**, 272 (23), 5950-5961.

7.Eanes, E. D.; Glenner, G. G., X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, 16 (11), 673-677.

Le diagnostic clinique de l'amylose est difficile puisque la détermination de sa nature est principalement histologique ce qui nécessite une biopsie.

I.1.2. Caractéristiques de la Maladie d'Alzheimer

En 1907 le neuropsychiatre Aloïs Alzheimer a décrit une maladie neurodégénérative caractérisée par deux types de lésions dans le cortex cérébral : des dépôts ou plaques amyloïdes (extracellulaires) et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou tangles pour les Anglo-Saxons) à l'intérieur des neurones (Fig. 2)^{8,9}. Les plaques amyloïdes sont constituées majoritairement de peptides de 40 à 42 acides aminés appelés A β (A β ₄₀ et A β ₄₂)^{9,10,11}. Ces dépôts amyloïdes sont la conséquence de l'agrégation des peptides A β sous forme de fibres. Les DNF intraneurales résultent de l'agrégation de la protéine tau sous forme de fibres de type amyloïde¹².

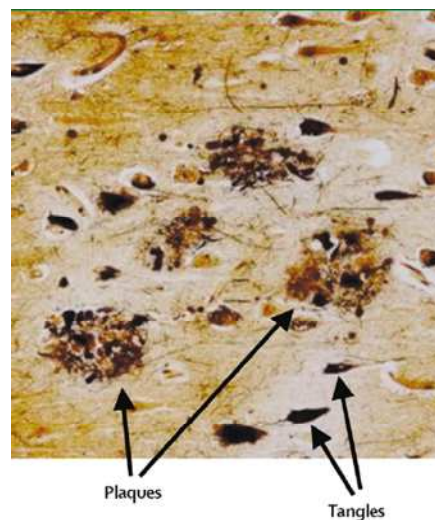


Fig. 2. Coupe d'un cortex cérébral d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer possédant des plaques séniles (plaques) et des dégénérescences neurofibrillaires (tangles)⁹

La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence chez les personnes âgées (environ 70% des cas). Elle touche près de 36 millions de personnes à travers le monde (OMS, 11 avril 2012), et sa prévalence devrait dépasser les 100 millions de cas en

8. Alzheimer, A., Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* **1907**, 64, 146-148.

9. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H., Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, 368 (9533), 387-403.

10. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120 (3), 885-890.

11. Hardy, J.; Selkoe, D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, 297 (5580), 353-356.

12. (a) Kosik, K. S.; Joachim, C. L.; Selkoe, D. J., Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83 (11), 4044-4048;

(b) Nukina, N.; Ihara, Y., One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **1986**, 99 (5), 1541-1544.

2050. La maladie peut être sporadique, touchant des personnes âgées de plus de 65 ans, ou héréditaire, beaucoup plus rare (1% des cas) et affectant des sujets de moins de 65 ans. Les symptômes cliniques de la maladie sont principalement des troubles cognitifs (perte de mémoire, troubles du langage, troubles de la reconnaissance des personnes et des objets etc....), et comportementaux regroupant des troubles affectifs et émotionnels (dépression, anxiété, agressivité, exaltation de l'humeur...). Le patient est désorienté, perd sa personnalité et n'est plus capable d'effectuer les tâches de la vie quotidienne.

Bien que cette pathologie soit multifactorielle (impliquant l'apolipoprotéine E4, les mitochondries, des enzymes telles que l'acétylcholinestérase ou la butyrylcholinestérase ..., Fig. 3)^{13,14}, notre étude se concentre sur la fibrillogénèse du peptide A β et de la protéine tau. L'origine, le mécanisme de formation et la structure des fibres formées par ces deux acteurs seront décrits dans les paragraphes suivants.

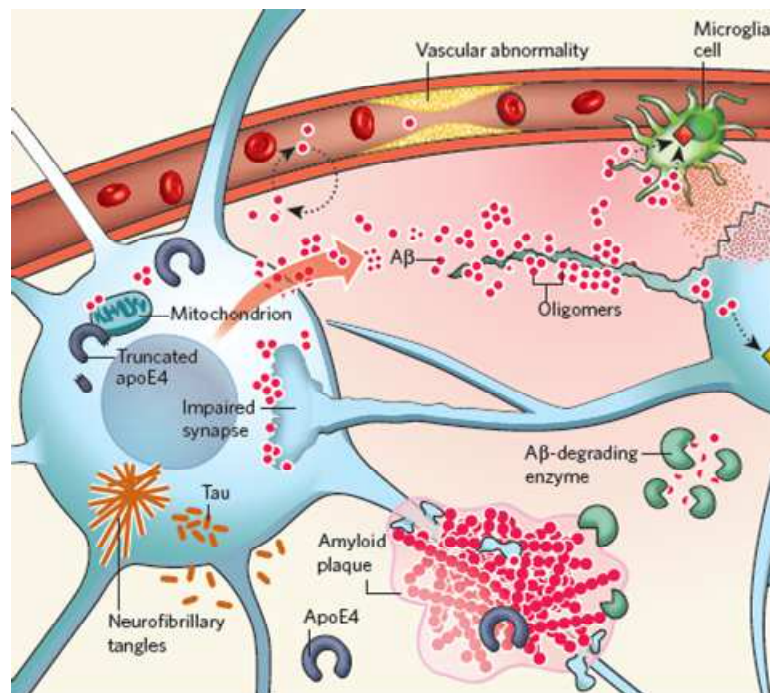


Fig. 3. Représentation des acteurs clés impliqués dans la maladie d'Alzheimer¹⁴, dont des plaques amyloïdes et des DNF (neurofibrillary tangles)

13.Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H., Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (17), 3030-3059.

14.Mucke, L., Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature.* **2009**, *461* (7266), 895-897.

I.1.3. Le peptide A β

Les peptides A β résultent d'une coupure protéolytique de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein)^{9,13,15}. Cette dernière est une glycoprotéine présente dans les membranes cellulaires de nombreux tissus. Elle est fortement exprimée dans le système nerveux central. L'APP peut subir deux types de coupure par deux enzymes. La première est l' α -sécrétase qui libère un peptide soluble dans le milieu extracellulaire, le sAPP α , laissant un peptide appelé C89 dans la membrane. La seconde est la β -sécrétase qui libère un peptide dans le milieu extracellulaire et laisse le peptide C99 dans la membrane. Les peptides transmembranaires peuvent subir une seconde coupure par la γ -sécrétase libérant le peptide p3 après coupure de C89 et le peptide A β après coupure de C99. Le peptide A β peut se composer de 39 à 43 acides aminés. Le peptide A β_{40} est majoritairement produit bien que le peptide A β_{42} soit le plus représenté dans les plaques amyloïdes¹⁰. Le peptide A β_{42} est également plus amylogène (tendance plus forte à former des fibres amyloïdes) que le peptide A β_{40} .

I.1.3.1. Mécanisme de formation des fibres

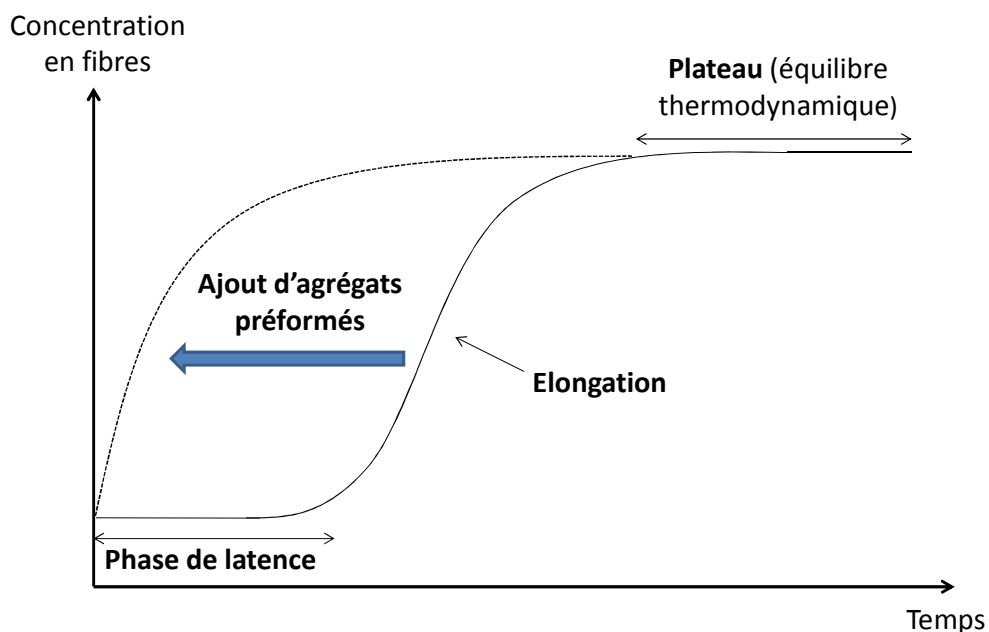


Fig. 4. Mécanisme de nucléation de la fibrillation

15.Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J.-C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M., β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* **1999**, 286 (5440), 735-741.

Le mécanisme de formation des fibres amyloïdes le plus largement admis est un mécanisme nucléation-dépendant^{16,17}. Lorsque la formation des fibres est observée en présence de colorants spécifiques de la formation de feuillets β (ThT, Rouge Congo), une courbe sigmoïdale est obtenue (Fig. 4)¹⁶. La phase de latence correspond à l'assemblage de monomères non structurés en structures non fibrillaires et solubles appelées oligomères. Cette phase correspond au temps nécessaire pour la formation d'un noyau auquel pourront s'ajouter des monomères ou des oligomères permettant l'élongation des fibres. La phase de latence peut être supprimée par addition d'agrégats préformés (noyaux ou « seed ») comme représenté ci-dessus (Fig. 4)^{16,18}. Une fois le noyau formé, l'ajout d'oligomères ou de monomères permet l'élongation des fibres selon une phase de croissance exponentielle (élongation) jusqu'à atteindre un équilibre (plateau).

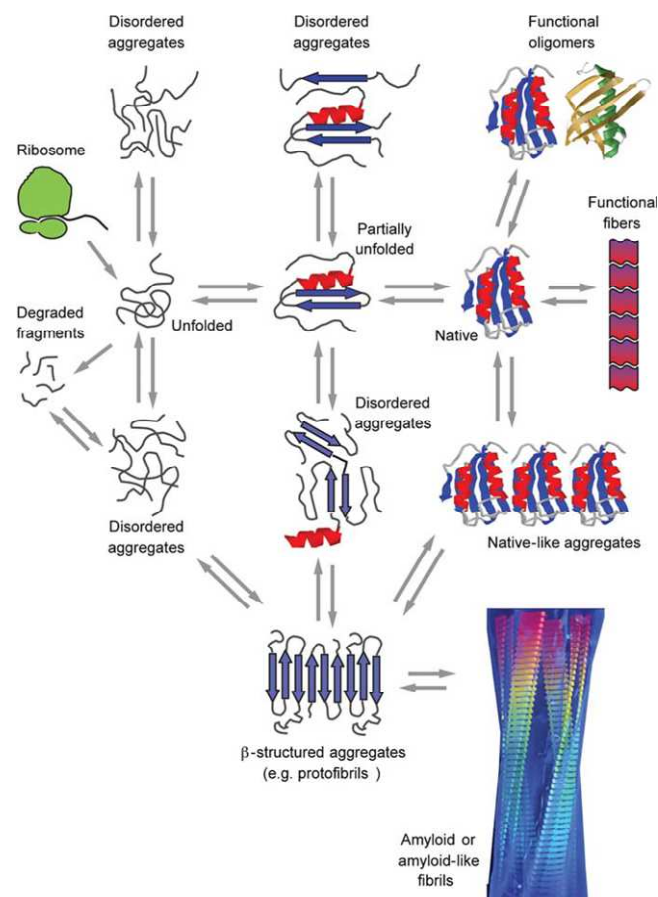


Fig. 5. Représentation schématique des différentes voies conduisant à la fibrillation du peptide A β ^{2b}

16. Jarrett, J. T.; Lansbury Jr, P. T., "Seeding" one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **1993**, 73 (6), 1055.

17. Lomakin, A.; Chung, D. S.; Benedek, G. B.; Kirschner, D. A.; Teplow, D. B., On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93 (3), 1125-1129.

18. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's β -Amyloid Fibrils. *Science* **2005**, 307 (5707), 262-265.

Les différentes voies de fibrillation sont représentées ci-dessus (Fig. 5). Plusieurs espèces oligomériques intermédiaires de la fibrillation, de formes et de tailles variables ont été identifiées¹⁹ incluant, par exemple, des protofibrilles^{20,21,22}, des assemblages annulaires²³, des ADDLs (A β -derived diffusible ligands)²⁴, des multimères (dimères, trimères, tétramères...)²⁵ et l'A β *56 (dodécamère)²⁶. Ces espèces peuvent se former à partir de peptides ou protéines non structurés, de protéines globulaires partiellement structurées ou dans leurs états natifs. Les oligomères correspondent à un état instable, partiellement ordonné et en équilibre avec les monomères. Ils représentent les premiers intermédiaires cinétiques de la fibrillation. Quelques exemples d'oligomères d'A β sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tabl. 3-).

Tabl. 3- Exemples d'espèces oligomériques de l'A β décrites dans la littérature

Espèces oligomériques	Caractéristiques	Références
Protofibrilles	Espèces intermédiaires isolées <i>in vitro</i> , fines courbées d'environ 5 nm d'épaisseur en microscopie.	20-22
Assemblages annulaires	Structures en forme d'anneaux isolées <i>in vitro</i> avec des diamètres extérieurs de 8-12 nm et intérieurs de 2-2,5 nm.	23
ADDLs	Espèces synthétiques plus petites que les annulaires. Affecteraient les voies de signalisation neuronales.	24
Aβ*56	Dodécamères apparents détectés dans l'hippocampe de souris transgéniques. Corrélent avec la perte de mémoire	26

19.Haass, C.; Selkoe, D. J., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8 (2), 101-112.

20.Harper, J. D.; Lansbury Jr, P. T., Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66 (1), 385-407.

21.(a) Harper, J. D.; Lieber, C. M.; Lansbury, P. T., Jr., Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid- β protein. *Chem. Biol.* **1997**, 4 (12), 951-9; (b) Harper, J. D.; Wong, S. S.; Lieber, C. M.; Lansbury, P. T., Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.* **1997**, 4 (2), 119-125.

22.(a) Walsh, D. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B., Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (35), 22364-22372; (b) Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condron, M. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B., Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (36), 25945-25952.

23.Bitán, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B., Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (1), 330-335.

24.Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K. L.; Lacor, P. N.; Lambert, M. P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L., Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (18), 10417-10422.

25.Bernstein, S. L.; Dupuis, N. F.; Lazo, N. D.; Wyttenbach, T.; Condron, M. M.; Bitán, G.; Teplow, D. B.; Shea, J.-E.; Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V.; Bowers, M. T., Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* **2009**, 1 (4), 326-331.

26.Lesné, S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Yang, A.; Gallagher, M.; Ashe, K. H., A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **2006**, 440 (7082), 352-357; 26.

De part la diversité des peptides et protéines amyloïdes existantes, il est raisonnable de penser que plusieurs voies conduisant à la formation de fibres sont possibles. Par exemple, Bitan et al.²³ ont démontré que les peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ forment des fibres selon deux voies distinctes. Les auteurs ont trouvé que dans des solutions préparées sans agrégats, le peptide Aβ₄₀ est présent sous forme de monomères, dimères, trimères et tétramères en équilibre les uns avec les autres, tandis que le peptide Aβ₄₂ existe sous forme de pentamères et hexamères (ou « paranuclei ») formant des structures sphériques semblables à des protofibres. Ceci impliquerait donc que le mécanisme d'assemblage des fibres est différent pour ces deux peptides en particulier pendant la phase de latence (plus courte pour l'Aβ₄₂, fibrillation plus rapide).

La séquence du peptide A β_{42} est présentée ci-dessous (Fig. 6).



27. Gorevic, P.; Castano, E.; Sarma, R.; Frangione, B., Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic Xray diffraction pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *147* (2), 854-862.

rayons X. Par la suite, il a été montré que les 17 premiers résidus de la partie N-terminale du peptide A β ne sont pas nécessaires pour la formation de fibres amyloïdes²⁸. Leur élimination permet d'amplifier la fibrillation.

La séquence A β_{16-20} , KLVFF (Fig. 6), est désignée comme nécessaire pour l'interaction entre les peptides A β ²⁹. Des études par modélisation moléculaire suggèrent que ces peptides s'assemblent par formation de feuillets β antiparallèles. D'après les auteurs, ce pentapeptide à lui seul ne forme pas de fibres. La même équipe a montré ensuite que la séquence A β_{14-23} est suffisante pour former des fibres amyloïdes³⁰. La formation de ponts salins par les résidus chargés et d'un cœur hydrophobe par les résidus apolaires est essentielle pour la fibrillation d'après des études par modélisation moléculaire. Enfin, la séquence A β_{25-35} possède la même neurotoxicité que le peptide natif³¹.

Des études de mutagénèse dirigée ont été menées afin d'identifier les résidus impliqués dans la fibrillation. Les mutations successives des résidus par des prolines dans les séquences A β_{12-26} et A β_{15-23} diminuent la capacité du peptide A β à former des fibres et augmentent sa solubilité³². Ceci impliquerait que le cœur hydrophobe du peptide A β est formé par la séquence LVFFAED. Ces résidus seraient impliqués dans la formation du feuillet β puisque la proline, du fait de sa géométrie, empêche sa formation. La mutation par une alanine des acides aminés L17, V18 et F20 n'affecte pas la fibrillation contrairement à la mutation du résidu F19.

Les résidus hydrophobes de la séquence A β_{30-36} , AIIGLMV, sont également essentiels pour la formation des fibres. La mutation des résidus I31, I32 et M35 du fragment A β_{25-35} diminue sa capacité à former des fibres²⁸. L'amidification de l'extrémité

28. Pike, C. J.; Overman, M. J.; Cotman, C. W., Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (41), 23895-23898.

29.(a) Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Arrest of β -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (15), 8545-8548; (b) Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Controlling Amyloid β -Peptide Fibril Formation with Protease-stable Ligands. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (19), 12601-12605.

30. Tjernberg, L. O.; Callaway, D. J. E.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehöök, C.; Terenius, L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C., A molecular model of Alzheimer amyloid β -peptide fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (18), 12619-12625.

31.(a) Yankner, B. A.; Duffy, L. K.; Kirschner, D. A., Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science (New York, NY)* **1990**, 250 (4978), 279; (b) Pike, C. J.; Walencewicz-Wasserman, A. J.; Kosmoski, J.; Cribbs, D. H.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W., Structure-Activity Analyses of β -Amyloid Peptides: Contributions of the β_{25-35} Region to Aggregation and Neurotoxicity. *J. Neurochem.* **1995**, 64 (1), 253-265.

32. Wood, S. J.; Wetzel, R.; Martin, J. D.; Hurle, M. R., Prolines and Amyloidogenicity in Fragments of the Alzheimer's Peptide β /A4. *Biochemistry* **1995**, 34 (3), 724-730.

C-terminale de ce peptide empêche sa fibrillation³³. D'après les auteurs, la partie C-terminale du fragment A β ₂₅₋₃₅ permettrait de stabiliser le feuillet β par interaction électrostatique avec la lysine K28. Enfin, d'après les travaux de l'équipe de Wetzel, les séquences A β ₁₋₁₄ et A β ₃₇₋₄₀, situées respectivement en N- et C-terminal du peptide A β ₄₀, sont peu impliquées dans le repliement de l'A β et sont relativement flexibles³⁴. Par contre, les séquences A β ₁₅₋₂₁ (QKLVFFA), A β ₂₄₋₂₈ (VGSNK) et A β ₃₁₋₃₆ (IIGLMV) étant sensibles aux mutations par des prolines sont impliquées dans la formation du cœur de la fibre, structuré en brin β -boucle-brin β . Dans le modèle de repliement proposé, la chaîne peptidique subit une inversion par formation de la boucle, c'est-à-dire une inversion de l'orientation des chaînes latérales permettant la formation des feuillets β croisés entre les peptides.

Des études de mutagénèse avec des cystéines ont permis de déterminer l'orientation des chaînes latérales ainsi que les interactions entre elles³⁵. La formation d'un pont disulfure par mutations des résidus L17 et L34 par des cystéines, permet la formation de fibres similaires à celles obtenues avec le peptide natif. Ensuite, la mutation par une cystéine des résidus du peptide A β ₄₀ a permis de proposer un modèle schématique des interactions des chaînes latérales dans le motif brin β -boucle-brin β ³⁶. En effet, le site d'alkylation de la cystéine permet de déterminer l'accessibilité des chaînes latérales. Cette étude confirme que la partie N-terminale est flexible tandis que les séquences A β ₁₆₋₂₀ (KLVFFA) et A β ₃₁₋₃₆ (IIGLMV) sont rigides. Un modèle d'interaction au sein du motif brin β -boucle-brin β a été proposé : les résidus 20 et 35 sont situés à l'extérieur de la boucle tandis que les résidus 17 et 34 sont projetés à l'intérieur (Fig. 7).

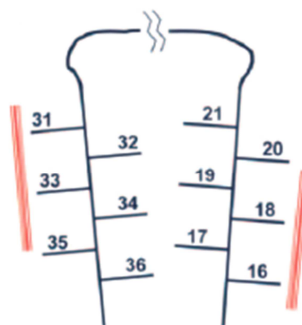


Fig. 7. Modèle de l'interaction entre les chaînes latérales du peptide A β ₄₀³⁶

33.Terzi, E.; Hoelzemann, G.; Seelig, J., Reversible Random Coil- β -Sheet Transition of the Alzheimer .beta.-Amyloid Fragment (25-35). *Biochemistry* **1994**, 33 (6), 1345-1350.

34.Williams, A. D.; Portelius, E.; Kheterpal, I.; Guo, J.; Cook, K. D.; Xu, Y.; Wetzel, R., Mapping A β amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **2004**, 335 (3), 833-842.

35.Shivaprasad, S.; Wetzel, R., An intersheet packing interaction in A β fibrils mapped by disulfide cross-linking. *Biochemistry* **2004**, 43 (49), 15310-15317.

36.Shivaprasad, S.; Wetzel, R., Scanning Cysteine Mutagenesis Analysis of A β -(1-40) Amyloid Fibrils. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (2), 993-1000.

1.1.3.3. Structure des fibres

Bien que certaines propriétés tinctoriales et structurales soient communes à toutes les fibres amyloïdes, plusieurs aspects de leurs structures individuelles restent inconnus. En effet, les fibres amyloïdes ne sont pas cristallisables et du fait de leur insolubilité elles ne peuvent pas être étudiées en solution par RMN. Durant plusieurs années, la microscopie électronique (MET) puis la diffraction aux rayons X et la microscopie à force atomique (AFM) étaient les principales techniques utilisées. Les progrès réalisés par la suite en RMN du solide (SS-RMN)^{18,37,38,39,40} ont permis d'établir des modèles plus précis. Ceci permet d'accéder à des informations plus détaillées sur la structure moléculaire ou supramoléculaire en s'affranchissant du problème d'insolubilité des fibres.

L'étude par microscopie a établi que les fibres sont composées généralement de deux protofilaments de 2 à 5 nm de diamètre qui se torsadent pour former une fibre de 7 à 13 nm d'épaisseur^{6a,41} (Fig. 8). Les études par diffraction aux rayons X ont montré qu'à l'intérieur du protofilament les peptides s'organisent en feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre (feuillets β croisés)⁶. Le motif par diffraction aux rayons X indique que les brins β dans un feuillet β croisé sont espacés de 4,7-4,8 Å et que les feuillets β sont espacés de 10 Å.

Malgré leurs caractéristiques communes, un polymorphisme des fibres formées par les peptides A β est observé en microscopie. Notamment, l'équipe de Tycko a montré que selon la préparation des échantillons du peptide A β_{40} , les morphologies des fibres observées en microscopie électronique et AFM diffèrent (enroulées ou rubans striés)¹⁸. De plus, lorsqu'un noyau de fibres préformées d'un échantillon est additionné à l'autre, la morphologie du noyau ajouté est propagée dans les nouvelles fibres formées. Ainsi, l'étude de la fibrillation *in vitro* n'est pas triviale. Les données obtenues par des équipes de recherche peuvent différer du fait de la complexité du mécanisme étudié mais aussi des conditions expérimentales utilisées. Plusieurs conformations et donc plusieurs structures des fibres du peptide A β ont été identifiées^{18,40}.

37. Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R., A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (26), 16742-16747.

38. Petkova, A. T.; Yau, W. M.; Tycko, R., Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Biochemistry* **2006**, 45 (2), 498-512.

39. Paravastu, A. K.; Leapman, R. D.; Yau, W.-M.; Tycko, R., Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (47), 18349-18354.

40. Tycko, R.; Wickner, R. B., Molecular Structures of Amyloid and Prion Fibrils: Consensus versus Controversy. *Acc. Chem. Res.* **2013**.

41. Sachse, C.; Fändrich, M.; Grigorieff, N., Paired β -sheet structure of an A β (1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (21), 7462-7466.

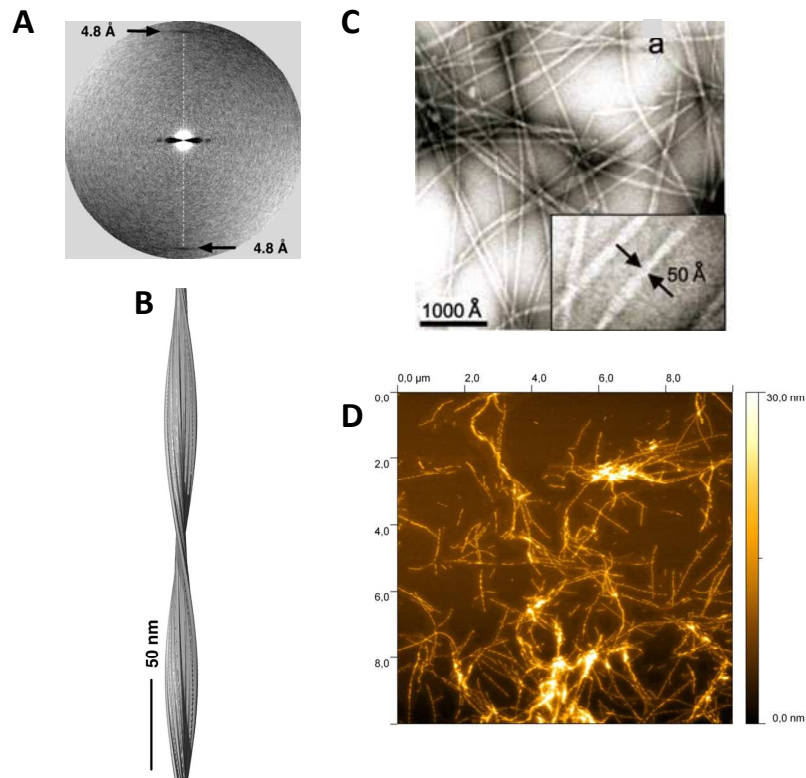


Fig. 8. Caractéristiques des fibres d'Aβ (A) Motif de diffraction aux rayons X⁴¹ (B) Reconstruction d'un protofilament⁴¹ (C) Microscopie électronique de l'Aβ₄₀³⁷ (D) AFM du peptide Aβ₄₀

Bien que plusieurs modèles soient proposés, l'équipe de Tycko a largement participé à la compréhension de la structure du peptide Aβ en établissant des modèles basés principalement sur des données de SS-RMN et de microscopie (MET et AFM)^{18,37,38,39,40}. Le modèle présenté en Fig. 9 montre qu'un peptide Aβ₄₀ se replie sur lui-même en forme de U constitué de deux brins β, perpendiculaires à l'axe de la fibre, et composés des résidus 12 à 24 et 30 à 40³⁷. Les résidus 25 à 29 forment un coude amenant les deux brins en contact *via* des interactions hydrophobes³⁷. Cette structure double couche contient un cœur hydrophobe formé par les résidus Q15, L17, F19, A21, I31, M35 et un pont salin formé entre les résidus D23 et K28 à l'intérieur du coude. Les autres acides aminés polaires se placent à l'extérieur du coude et dans l'extrémité N-terminale (non-représentée sur ce modèle car elle n'est pas structurée). Les chaînes latérales des résidus A30, I32, L34, V36 et V40 forment une face hydrophobe.

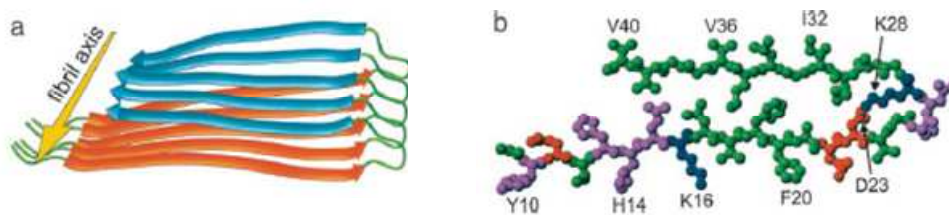


Fig. 9. Modèle structurale des feuillets β croisés du peptide A β (a) Modèle ruban (b) Modèle atomique (vert : hydrophobe, violet : polaire, rouge : chargé négativement, bleu : chargé positivement)³⁷

Par la suite, Tycko et col.³⁸ proposent un modèle pour l'assemblage de la fibre dans lequel les peptides A β_{40} , chacun replié en une double couche de brins β , s'assemblent *via* des liaisons hydrogènes pour former des feuillets β croisés parallèles. Les deux peptides A β interagissent sur eux-mêmes selon une symétrie C_{2z} dans les conditions expérimentales de SS-RMN utilisées bien qu'une symétrie C_{2x} soit également probable (Fig. 10). Ce modèle est corrélé aux dimensions du protofilament mesurées en microscopie et il établit qu'un protofilament est constitué au minimum de deux unités β croisées.

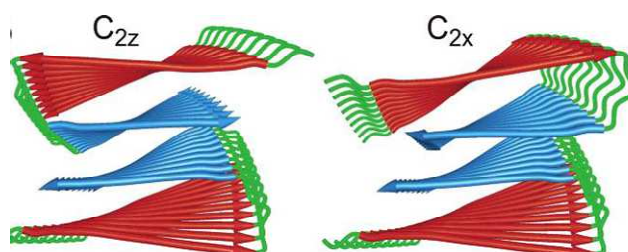


Fig. 10. Modèle structural (rubans) du protofilament du peptide A β_{40} selon une symétrie C_{2z} ou C_{2x} ³⁸

Récemment, l'équipe de Tycko a établi un autre modèle dans lequel le peptide A β_{40} adopte la même conformation repliée en U mettant en jeu des interactions hydrophobes³⁹. Cependant la conformation du coude est différente (plus d'acides aminés) ainsi que le nombre d'unités de feuillets β croisés formant le protofilament (trois dans ce nouveau modèle) et la symétrie de l'édifice (symétrie C_3 dans ce second modèle). Dans leur premier modèle, les fibres étaient striées (striated ribbons) et étaient obtenues en agitant l'échantillon. En revanche dans le second modèle, les fibres sont torsadées et ont été obtenues sans agitation. Dans ce nouveau modèle, les peptides A β s'agencent de manière à former un cœur hydrophobe tandis que les chaînes polaires se situent à l'extérieur, ce qui est consistant avec la stabilisation hydrophobe d'une fibre amyloïde.

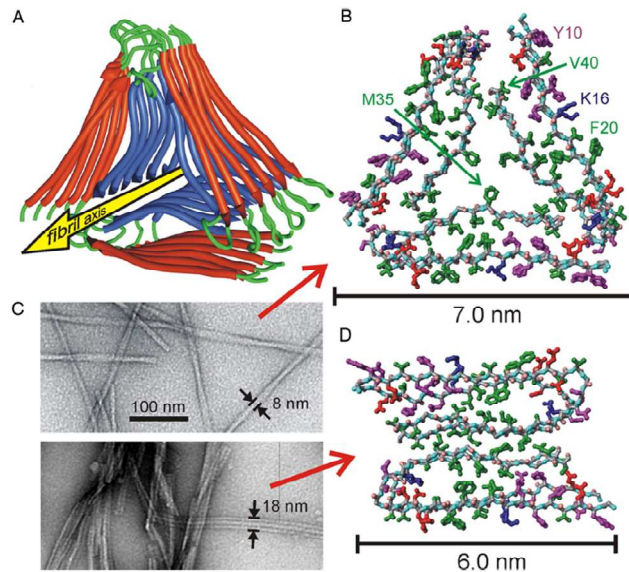


Fig. 11. Modèles expérimentaux du repliement des peptides Aβ₄₀³⁹ (A) Modèle en rubans des fibres enroulées (symétrie C₃) (B) Modèle atomique des fibres enroulées vu par dessous (vert : hydrophobe, magenta : polaire, rouge : chargé négativement, bleu : chargé positivement) (C) Comparaison des fibres torsadées (en haut) et des fibres en rubans striés (en bas) du peptide Aβ₄₀ observées en microscopie électronique (D) Modèle atomique des fibres striées obtenu par Petkova et al^{37,38}

I.1.4. La protéine tau

La protéine tau est une protéine associée aux microtubules (famille des MAP ou Microtubules Associated Protein)^{42,43}. Cette protéine est principalement localisée dans le système nerveux central à l'intérieur des neurones (axones). Son rôle physiologique consiste à stabiliser les dimères de tubuline constituant les microtubules. Ces derniers sont des composants du cytosquelette impliqués dans la morphologie cellulaire, la division cellulaire et le transport d'organelles (mitochondries, lysosomes, vésicules d'endocytose et d'exocytose). Les microtubules peuvent s'assembler et se désassembler selon un processus dynamique. Ainsi la stabilisation de ces assemblages par la protéine tau est essentielle pour assurer le transport axonal dans les neurones. La protéine tau est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer^{12,43,44}. Dans cette pathologie, la protéine tau se retrouve sous forme d'agrégats dans les

42. Gustke, N.; Trinczek, B.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* **1994**, 33 (32), 9511-9522.

43.(a) Buée, L.; Bussièrre, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **2000**, 33 (1), 95-130; (b) Buée, L.; Delacourte, A., Tauopathie et maladie d'Alzheimer, un processus dégénératif à part entière. *Psychol Neuropsychia* **2006**, 4 (4), 261-273.

44. Kolarova, M.; García-Sierra, F.; Bartos, A.; Ricny, J.; Ripova, D., Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 2012.

neurones appelés dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou tangles pour les Anglo-Saxons). Ces dernières résultent de l'accumulation de la protéine tau sous forme de fibrilles constituées de paires de filaments organisés en hélice (PHF pour Paired Helical Filaments pour les Anglo-Saxons)^{12,44,45}. Les agrégats de tau peuvent également adopter une morphologie différente de celle des DNF dans différents types cellulaires du système nerveux central (neurones, astrocytes, oligodendrocytes). Dans la maladie d'Alzheimer l'apparition et la propagation des DNF suivent un chemin séquentiel et hiérarchisé⁴⁶. Elles apparaissent dans la région de l'hippocampe puis s'étendent dans le cortex cérébral. Les voies de propagation de ces lésions sont corrélées au degré de perte neuronale ce qui permet une division la maladie en six phases cliniques⁴⁶.

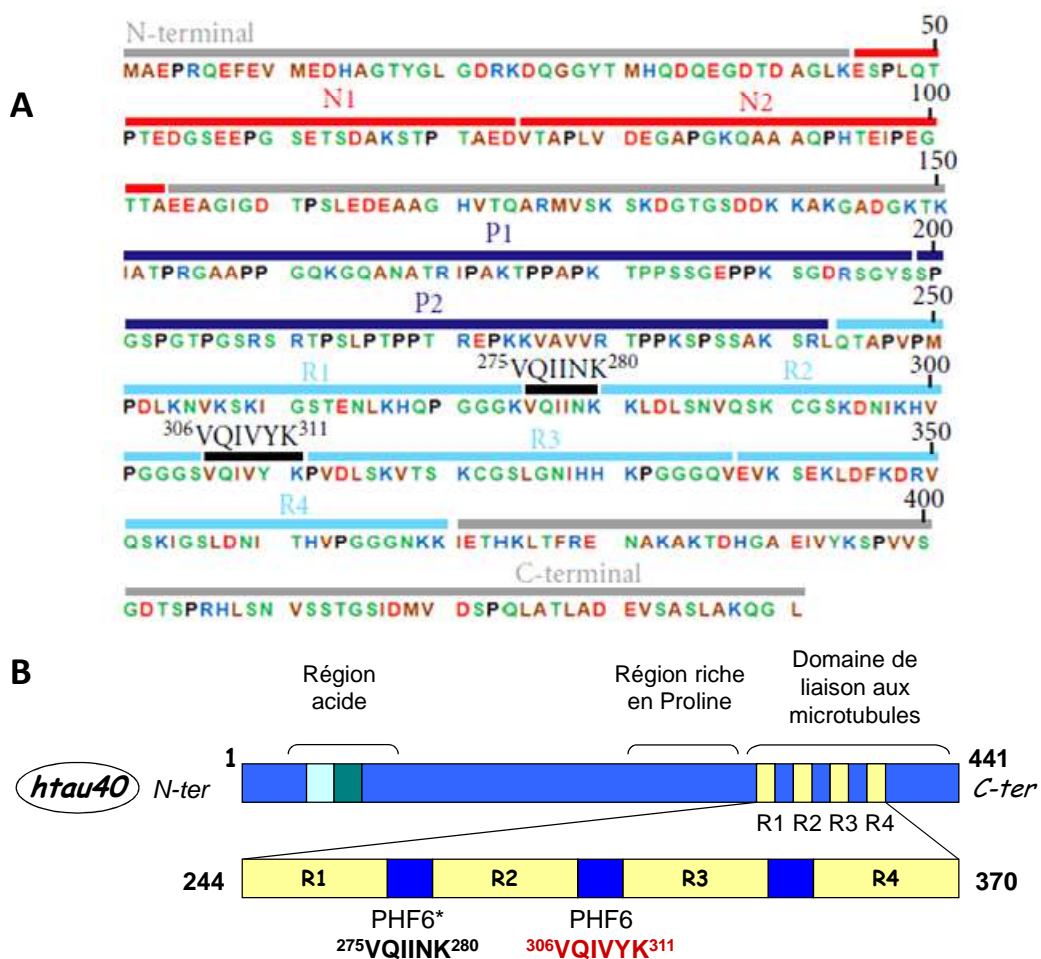


Fig. 12. La protéine tau : (A) Séquence⁴⁴ (bleu : résidus basiques chargés positivement, vert : résidus polaires non chargés, marron : résidus non polaires, rouge : résidus acides chargés négativement) (B) Représentation schématique des différents domaines

45.Mandelkow, E.; Von Bergen, M.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M., Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* **2007**, *17* (1), 83-90.

46.Braak, H.; Braak, E., Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl)*. **1991**, *82* (4), 239-259.

La séquence de la protéine tau est présentée dans la figure ci-dessus (Fig. 12). Plusieurs domaines au sein de la protéine ont été identifiés (Fig. 12)⁴³. Une région acide se situe en N-terminal. Une région riche en proline est présente au centre de la protéine. Le C-terminal de la protéine est constitué d'un domaine de liaison aux microtubules (ou MTBR pour Microtubules Binding Region) contenant quatre motifs de répétition, R1 à R4 et constituant la partie basique de la protéine.

Le gène de la protéine tau est porté par le chromosome 17. Son épissage alternatif produit six ARN messagers traduits en six isoformes protéiques^{42,43,47} (Fig. 13). Ces isoformes contiennent de 352 à 441 acides aminés. Deux familles d'isoformes existent selon la présence ou non du motif R2 résultant de la traduction de l'exon 10 du gène de la protéine. On distingue ainsi trois isoformes tau-3R (ou 10-) dépourvues du motif R2, des trois isoformes tau-4R (ou 10+) contenant le motif R2. Ces isoformes se différencient également selon l'absence d'une séquence de 29 acides aminés codée par les exons 2 ou 3 (0N ou 2-3-), la traduction d'une de ces séquences (1N ou 2+3-) ou des deux séquences (2N ou 2+3+). Les six isoformes présentées en Fig. 13 sont ainsi produites. L'isoforme 0N4R est la seule isoforme présente au stade fœtal tandis que les autres sont exprimées à l'âge adulte. Les isoformes 4R possèdent une meilleure affinité pour les microtubules et les stabilisent davantage. Les six isoformes ont été retrouvées en quantités égales dans les PHF extraits de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer.

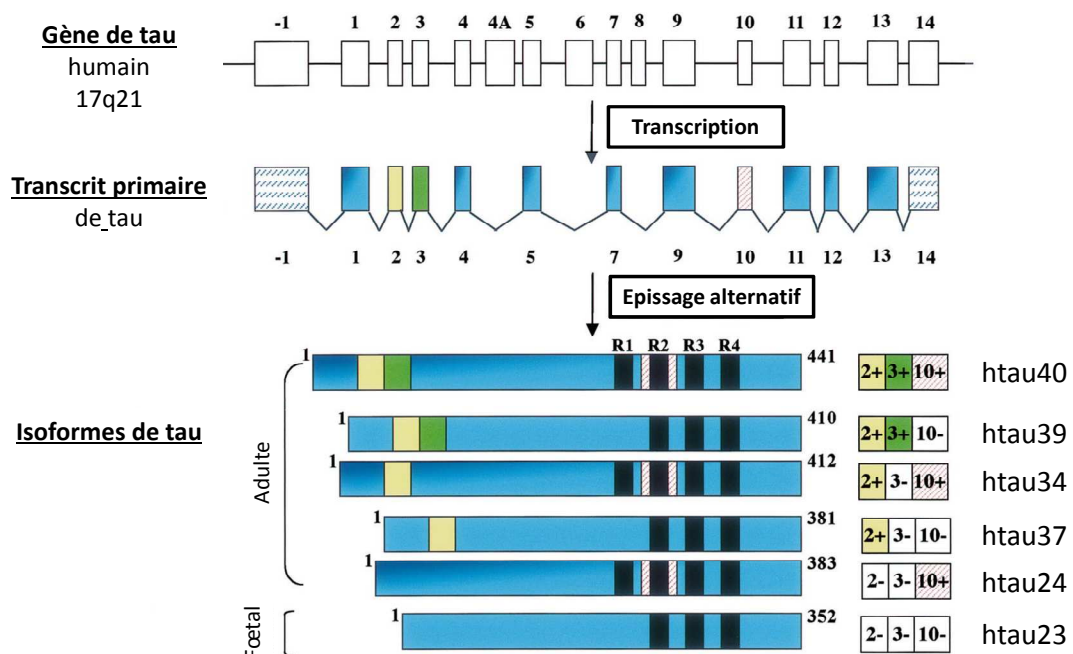


Fig. 13. Schéma de l'expression des six isoformes de la protéine tau⁴²

47.Goedert, M.; Spillantini, M.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R., Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **1989**, 3 (4), 519-526.

La stabilisation des microtubules par la protéine tau est également régulée par son niveau de phosphorylation. En effet, cette protéine contient 80 résidus sérine et thréonine dont une trentaine se sont avérés être phosphorylés⁴³. Plusieurs de ces sites sont situés notamment de part et d'autre ou à l'intérieur des motifs de répétition. Une balance entre phosphorylation et déphosphorylation, respectivement effectuées par des kinases et phosphatases, permet de réguler l'affinité de la protéine tau pour les microtubules. La forme non phosphorylée de la protéine se lie préférentiellement aux microtubules.

Dans sa forme pathologique, la protéine tau est hyperphosphorylée, ce qui entraîne sa désolidarisation des microtubules et provoquerait le désassemblage de ces derniers^{12,43,44}. D'autres modifications post-transcriptionnelles (glycosylation, ubiquitination...) sont décrites concernant la forme pathologique de la protéine tau mais sa forme hyperphosphorylée étant la plus représentée dans les fibres et les DNF, elles ne seront pas détaillées ici. Cette anomalie de phosphorylation serait causée principalement par un dérèglement de l'activité de kinases et de phosphatases. Notamment, la kinase GSK-3 β jouerait un rôle important en conditions physiologiques et pathologiques. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que cette enzyme serait responsable de la phosphorylation des résidus Ser₁₉₉, Thr₂₃₁, Ser₃₉₆, Ser₄₀₀, Ser₄₀₄ et Ser₄₁₅ (numérotés selon l'isoforme la plus longue) dans les PHF^{43,44}. Cette hyperphosphorylation entraîne un changement de conformation et un mauvais repliement de la protéine tau ce qui provoque son agrégation sous forme de fibres.

Dans sa forme native, la protéine tau est désordonnée, très flexible, hautement soluble et résiste à des traitements agressifs tels que des températures élevées et des traitements acides⁴⁵. De la même façon, les PHF sont très résistants aux températures et forces ioniques élevées mais sont désassemblés par les détergents et des valeurs extrêmes de pH ce qui pourrait suggérer la formation de ponts salins dans leur structure⁴⁵. La liaison des PHF à des colorants tels que la thioflavine S (ThS) et la thioflavine T (ThT) indique qu'ils possèdent une structuration en feuillets β croisés^{48,49}. Leur motif observé par diffraction aux rayons X confirme qu'ils contiennent des structures en feuillets β croisés (distance entre les brins de 4,7 Å et espacement entre les feuillets β

48.Friedhoff, P.; Schneider, A.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* **1998**, 37 (28), 10223-10230.

49.Gamblin, T. C.; Berry, R. W.; Binder, L. I., Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis. *Biochemistry* **2003**, 42 (51), 15009-15017.

de 10 Å)⁵⁰. La fibrillation de la protéine tau est très lente *in vitro* lorsqu'elle n'est pas phosphorylée et nécessite de hautes concentrations en protéine. La cinétique de fibrillation peut être accélérée par l'introduction d'inducteurs^{49,51} qui permettent d'amorcer la fibrillation pour de plus faibles concentrations en protéine. Ces derniers peuvent être des inducteurs polyanioniques⁵¹ tels que l'héparine^{48,52} ou des polyglutamate⁵¹, et des acides gras tels que l'acide arachidonique^{53,54,55}. Il est supposé que l'apport des charges négatives par ces inducteurs permet de compenser les charges positives de la protéine et ainsi de favoriser l'arrangement de la protéine dans une conformation compétente pour la fibrillation.

La morphologie des fibres obtenues peut différer selon les conditions expérimentales utilisées *in vitro* (pH, température, force ionique et nature de l'inducteur)^{56,57,58}. Elles peuvent être semblables aux PHF (« enroulées »), semblables à des rubans entortillés ou droites lorsqu'elles sont observées par microscopie électronique ou à force atomique⁵⁷. Les fibres extraites de tissus cérébraux de patients humains sont constituées principalement de deux protofilaments enroulés l'un avec l'autre quand elles sont observées en microscopie électronique, ce qui leur a donné leur nom de PHF. Elles possèdent une séparation des répétitions de l'enroulement d'environ 75 à 80 nm et une épaisseur variant de 10 à 22 nm avec un diamètre pour chaque brin d'environ 10 nm⁵⁷. Les DNF extraites des tissus contiennent dans une faible proportion (environ 5%) des fibres qui ne sont pas enroulées mais droites, comme si les deux brins s'allongeaient parallèlement l'un à côté de l'autre. L'observation des PHF montrent une structure semblable à un ruban enroulé avec une même distance de séparation de 80 nm environ

50. Berriman, J.; Serpell, L. C.; Oberg, K. A.; Fink, A. L.; Goedert, M.; Crowther, R. A., Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (15), 9034-9038.

51. Carlson, S. W.; Branden, M.; Voss, K.; Sun, Q.; Rankin, C. A.; Gamblin, T. C., A complex mechanism for inducer mediated tau polymerization. *Biochemistry* **2007**, *46* (30), 8838-8849.

52. Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M.; Hasegawa, M.; Smith, M.; Crowther, R., Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **1996**, *383* (6600), 550-553.

53. Wilson, D. M.; Binder, L. I., Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid β peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150* (6), 2181.

54. Chirita, C. N.; Necula, M.; Kuret, J., Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (28), 25644-25650.

55. Gamblin, T. C.; King, M. E.; Kuret, J.; Berry, R. W.; Binder, L. I., Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* **2000**, *39* (46), 14203-14210.

56. Barghorn, S.; Mandelkow, E., Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **2002**, *41* (50), 14885-14896.

57. Xu, S.; Brunden, K. R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., Characterization of tau fibrillization in vitro. *Alzheimers Dement* **2010**, *6* (2), 110-117.

58. Wegmann, S.; Jung, Y. J.; Chinnathambi, S.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Muller, D. J., Human tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (35), 27302-27313.

mais sans subdivision évidente en deux brins. Le problème de la détermination des sous-unités des PHF et de leur interaction n'est pas résolu à ce jour.

1.1.4.1. Mécanisme de formation des fibres

Le mécanisme d'assemblage des fibres *in vitro* pour les isoformes de tau est principalement, comme pour la plupart des fibres amyloïdes, un mécanisme de nucléation-élongation^{56,59,60,61}. Un changement de conformation des monomères entraîne la formation d'intermédiaires constituant le noyau à partir duquel l'élongation des fibres a lieu. Comme pour le peptide A β , la nucléation correspond à une phase de latence qui est suivie d'une phase de croissance exponentielle des fibres puis d'une phase stationnaire. Friedhoff et al ont montré que plusieurs mutants de tau s'assemblent selon un motif de nucléation⁵⁹. La formation de dimères liés de façon covalente *via* la cystéine C322 formerait le noyau permettant la croissance des fibres. Un mutant, avec une alanine remplaçant cette cystéine, possède une cinétique de fibrillation beaucoup plus longue mais qui peut être fortement accélérée par l'addition de noyaux de fibres préformées (seeds) afin de diminuer la phase de latence. Les auteurs suggèrent que les noyaux des PHF contiendraient 8 à 14 monomères de tau (4 à 7 dimères). La formation de dimères et la nucléation seraient les facteurs limitant la formation des fibres. Le mécanisme proposé par les auteurs est présenté ci-dessous (Fig. 14).

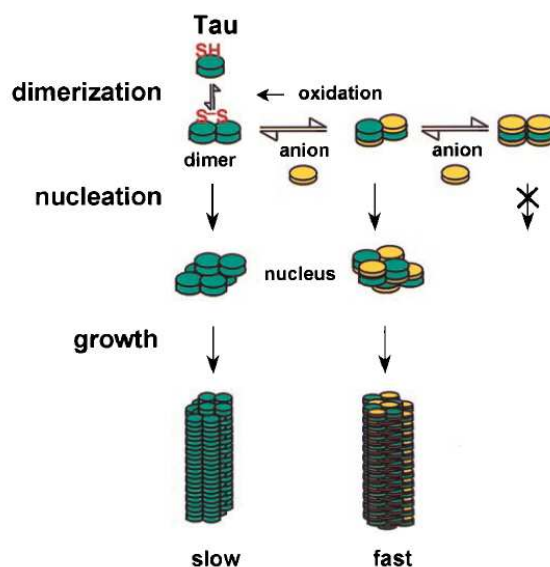


Fig. 14. Mécanisme de nucléation proposé par Friedhoff et al⁵⁹

59.Friedhoff, P.; Von Bergen, M.; Mandelkow, E.-M.; Davies, P.; Mandelkow, E., A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95 (26), 15712-15717.

60.Kuret, J.; Chirita, C. N.; Congdon, E. E.; Kannanayakal, T.; Li, G.; Necula, M.; Yin, H.; Zhong, Q., Pathways of tau fibrillization. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739 (2-3), 167-178.

61.Congdon, E. E.; Kim, S.; Bonchak, J.; Songrug, T.; Matzavinos, A.; Kuret, J., Nucleation-dependent Tau Filament Formation: The importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. . *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (20), 13806-13816.

Congdon et al⁶¹ ont obtenu des résultats similaires avec la protéine tau complète. La fibrillation commence par la formation d'assemblages adoptant une conformation compétente. L'élongation est alors réalisée par l'addition de monomères à l'extrémité des filaments naissants. Les filaments isolés sur le plateau de fibrillation sont formés de deux protomères de tau. Peterson et al⁶² ont montré que des oligomères solubles se forment lors de la fibrillation d'un mutant tau¹⁸⁷ comprenant une partie du C-ter de tau (acides aminés 255-441). Ces espèces résulteraient d'interactions intermoléculaires des motifs PHF6 (³⁰⁶VQIVYK³¹¹) et PHF6* (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰) provoquées par l'addition d'héparine. Ces résultats supportent l'implication de ces motifs et indiquent que les oligomères permettraient de constituer le noyau de la fibrillation. Chirita et al⁶³ ont également mis en évidence la formation d'oligomères métastables ne se formant qu'en présence d'héparine et de nature probablement non-fibrillaire. Ces oligomères peuvent cependant se lier à la ThS ce qui suggère la présence de structures en feuillets β . D'après les auteurs la nucléation se fait à partir de ces intermédiaires. Xu et al⁵⁷ ont également mis en évidence la formation d'oligomères sphériques (SNU pour Spherical Nucleation Units) au stade précoce de la fibrillation. Leur quantité diminue considérablement lorsque le nombre de fibres augmente. Ces oligomères sphériques s'assembleraient pour former des filaments de morphologies droites ou enroulées. Les auteurs estiment d'après leurs observations en microscopie électronique que 74 unités de tau environ constituent ces oligomères. Ils proposent également un mécanisme alternatif à celui de nucléation-élongation. La fibrillation de la protéine tau pourrait se faire selon un mécanisme d'agrégation colloïdale de type linéaire dans lequel des sphères colloïdales constitueraient le noyau. Maeda et al⁶⁴ ont mis en évidence des oligomères, à partir d'extraits de tissus cérébraux, de morphologie semblable (sphériques, contenant environ 40 monomères de tau). Ils ont montré que ces derniers peuvent lier la ThT ce qui suggère que ces espèces possèdent une structure en feuillets β .

1.1.4.2. Domaines et structures impliqués dans la fibrillation de tau

De nombreuses études *in vitro* ont été menées dans le but de comprendre les mécanismes de fibrillation notamment en déterminant les séquences impliquées dans ce processus^{48,49,56,57}. Le cœur des PHF est principalement constitué de la partie C-terminale

62. Peterson, D. W.; Zhou, H.; Dahlquist, F. W.; Lew, J., A soluble oligomer of tau associated with fiber formation analyzed by NMR. *Biochemistry* **2008**, 47 (28), 7393-7404.

63. Chirita, C. N.; Kuret, J., Evidence for an Intermediate in Tau Filament Formation†. *Biochemistry* **2004**, 43 (6), 1704-1714.

64. Maeda, S.; Sahara, N.; Saito, Y.; Murayama, M.; Yoshiike, Y.; Kim, H.; Miyasaka, T.; Murayama, S.; Ikai, A.; Takashima, A., Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments†. *Biochemistry* **2007**, 46 (12), 3856-3861.

de la protéine tau et en particulier du troisième motif de liaison aux microtubules (R3)⁶⁵. La protéine tau native est désordonnée alors que les PHF présentent une augmentation de structures en feuillets β ^{50,66}. La partie C-terminale, possédant les motifs de répétition de liaison aux microtubules, passe d'un état non structuré à une structure adoptant une conformation en feuillets β . Von Bergen et al⁶⁷ ont montré que la digestion de R3 conduit à un peptide de 43 acides aminés nommé PHF43 qui peut former de fins filaments enroulés capables d'induire par nucléation la formation de PHF *bona fide* par la protéine tau entière. La liaison de PHF43 avec des séquences peptidiques de la protéine tau indique que la séquence minimale d'interaction est la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ (PHF6) présente au début du motif R3. PHF43 se lie également avec la séquence ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ (PHF6*), présente au début du motif R2, mais avec une affinité plus faible. Cet hexapeptide possède également une forte tendance à former des fibres. L'assemblage sous forme de fibres de PHF43 et PHF6 s'accompagne d'un passage d'une forme désordonnée (random coil) à une structure en feuillets β . La mutation ponctuelle par des prolines dans la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ empêche la formation de fibres. Ces résultats indiquent que la fibrillation de tau serait induite par la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ formant une structure locale en feuillets β enfouie dans la protéine qui est majoritairement désordonnée. Li et al⁶⁸ ont ensuite démontré que la délétion d'un des deux motifs nommés PHF6 (³⁰⁶VQIVYK³¹¹) et PHF6* (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰) affecte la fibrillation d'un mutant de tau mais que seul PHF6 est indispensable pour la formation du filament. La délétion de la séquence VQI dans ces motifs diminue la fibrillation mais ne l'empêche pas tandis que la délétion du résidu lysine K311 de PHF6 abolit totalement la fibrillation. La mutation K311D empêche également la fibrillation alors que les mutants K311A et K311R n'ont pas d'effet. La délétion des motifs PHF6 et PHF6* abolit aussi l'agrégation de tau dans les modèles de cellules et dans les modèles animaux. Enfin, Pérez et al⁶⁹ ont montré que de petits peptides N-acétylés de 3 à 6 acides aminés (avec une fonction amide en C-ter) correspondant ou contenant une partie de la séquence PHF6 (d'Ac-YK jusqu'à Ac-VQIVYK) peuvent former des filaments, chacun étant composé de deux protofilaments de 5 nm d'épaisseur en microscopie électronique. Ces peptides forment des structures en feuillets

65.von Bergen, M.; Barghorn, S.; Müller, S. A.; Pickhardt, M.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Davies, P.; Aebi, U.; Mandelkow, E., The Core of Tau-Paired Helical Filaments Studied by Scanning Transmission Electron Microscopy and Limited Proteolysis†. *Biochemistry* **2006**, 45 (20), 6446-6457.

66.Barghorn, S.; Davies, P.; Mandelkow, E., Tau Paired Helical Filaments from Alzheimer's Disease Brain and Assembled in Vitro Are Based on β -Structure in the Core Domain†. *Biochemistry* **2004**, 43 (6), 1694-1703.

67.Von Bergen, M.; Friedhoff, P.; Biernat, J.; Heberle, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97 (10), 5129-5134.

68.Li, W.; Virginia, M.-Y. L., Characterization of two VQIXK motifs for tau fibrillization in vitro. *Biochemistry* **2006**, 45 (51), 15692-15701.

69.Perez, M.; Santa-María, I.; Tortosa, E.; Cuadros, R.; Valle, M. d.; Hernández, F.; Moreno, F. J.; Avila, J., The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation. *J. Neurochem.* **2007**, 103 (4), 1447-1460.

β croisés pouvant se placer de façon parallèle ou antiparallèle. Ces résultats suggèrent que la séquence YVK constitue le cœur de PHF6 et que l'interaction entre les motifs PHF6 permettrait d'initier la nucléation pour conduire à des fibres présentant une morphologie semblable à celle des PHF.

Plusieurs mutants ont été développés pour étudier la fibrillation de la protéine tau *in vitro* dont les mutants K18 et K19 qui sont les plus utilisés (Fig. 15)^{66,70}.

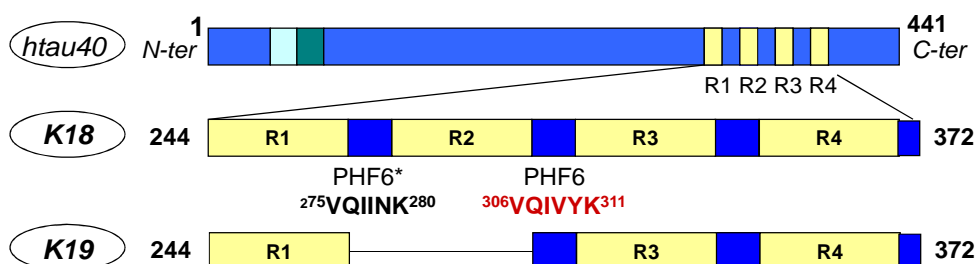


Fig. 15. Structure des mutants de la protéine tau

Ces mutants correspondent à la partie C-terminale contenant les motifs de répétition de liaison aux microtubules : le mutant K18 étant composé des motifs R1 à R4 et le mutant K19 des motifs R1, R3 et R4. Ces mutants forment des fibres *in vitro* semblables aux PHF extraits de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer en présence d'inducteurs polyanioniques et leur cinétique d'agrégation est beaucoup plus rapide que celle des isoformes de la protéine tau. Le mutant K18 Δ K280 (avec la lysine 280 supprimée) est aussi largement utilisé car il peut s'agréger sous forme de fibres sans la présence d'inducteur⁷¹. Ces mutants ont permis d'une part de faciliter l'étude de la fibrillation *in vitro* (mécanisme, influence des pH, inducteurs polyanioniques...) ⁷⁰ et d'autre part le criblage de banque de données de molécules pour tester leur capacité à inhiber la fibrillation de la protéine tau *in vitro*⁷².

La capacité de ces mutants à former des fibres indique que les domaines de répétition sont essentiels dans la fibrillation de la protéine tau. Des expériences de dichroïsme circulaire montrent une forte structuration en feuillets β lors de l'agrégation de ces mutants^{56,66}. Pour la protéine entière, la formation de feuillets β est peu distinguable par cette technique, ce qui est consistant avec l'enfouissement de ces

70.Jeganathan, S.; von Bergen, M.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments†. *Biochemistry* **2008**, 47 (40), 10526-10539.

71.Fischer, D.; Mukrasch, M. D.; von Bergen, M.; Klos-Witkowska, A.; Biernat, J.; Griesinger, C.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M., Structural and Microtubule Binding Properties of Tau Mutants of Frontotemporal Dementias†. *Biochemistry* **2007**, 46 (10), 2574-2582.

72.Bulic, B.; Pickhardt, M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E.-M.; Waldmann, H.; Mandelkow, E., Development of Tau Aggregation Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (10), 1740-1752.

structures dans les fibres. Plusieurs études ont démontré que le cœur des PHF est constitué des motifs de répétition. La protéolyse des PHF obtenus *in vitro* avec les mutants K18, K19 et de la protéine tau entière (htau40) ainsi que des PHF extraits de cerveaux Alzheimer conduit à des fragments résistants de tailles identiques correspondant à une partie de la région des motifs de répétition R⁶⁶.

Les PHF obtenus *in vitro* à partir des différentes isoformes de tau possèdent un cœur rigide et des extrémités plus floues (« fuzzy coat » ou manteau flou). En revanche, les PHF obtenus *in vitro* avec les mutants K18 et K19 présentent des extrémités plus nettes. La détermination de la masse par longueur des filaments indique que les PHF des mutants sont plus compactes que ceux de la protéine htau40. Ceci serait en accord avec les études suggérant que la partie N-terminale de la protéine et son extrémité C-terminale interagiraient avec la région de liaison aux microtubules et empêcheraient ou ralentiraient son agrégation⁴⁹.

Le rôle des extrémités C- et N-terminales dans l'agrégation de la protéine tau a été étudié *in vitro*. Dans les PHF la protéine tau est tronquée à ses deux extrémités C- et N-terminales⁷³. Elle subirait plusieurs coupures enzymatiques au cours du processus de fibrillation et chaque fragment peut être reconnu par des anticorps spécifiques.

La coupure de 12 acides aminés (tauΔ430-441) à 121 acides aminés (tauΔ321-441) de l'extrémité C-terminale de tau permet d'accélérer la fibrillation *in vitro* en présence d'inducteur⁷⁴. En revanche une délétion additionnelle de 7 acides aminés du motif R3 (³¹⁴DLSKVTS³²⁰) abolit la fibrillation *in vitro*. Ceci indique également que seule une partie des motifs R (R1, R2 et une partie de R3) est cruciale pour la fibrillation. De plus, la fibrillation est accélérée par la pseudo-phosphorylation des sérines 396 et 404 (remplacement par des acides glutamiques). Des travaux supplémentaires indiquent que l'extrémité C-terminale de htau40 inhibe sa fibrillation en interagissant avec la région des motifs de liaisons aux microtubules⁷⁵.

La partie N-terminale est également impliquée dans la régulation de la fibrillation de la protéine tau. L'anticorps Alz50 marque les lésions de tau au stade précoce de la maladie d'Alzheimer⁷³. Sa liaison implique des acides aminés de l'extrémité N-terminale

73.Binder, L. I.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Garcia-Sierra, F.; Berry, R. W., Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **2005**, 1739 (2), 216-223.

74.Abraha, A.; Ghoshal, N.; Gamblin, T. C.; Cryns, V.; Berry, R. W.; Kuret, J.; Binder, L. I., C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* **2000**, 113 (21), 3737-3745.

75.Berry, R.; Abraha, A.; Lagalwar, S.; LaPointe, N.; Gamblin, T.; Cryns, V.; Binder, L., Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* **2003**, 42 (27), 8325-8331.

de la protéine (1 à 15) et du motif R3 (312 à 322)⁷⁶. Le passage de l'état désordonné de la protéine tau à l'état de filament implique son repliement amenant l'extrémité N-terminale à proximité du C-terminal dans la région des motifs R. Des peptides issus de l'extrémité N-terminale et contenant obligatoirement la séquence 18-42 de htau40 inhibent la fibrillation de tau *in vitro* en interagissant avec l'extrémité C-terminale (résidus 392-421). Ils permettent de garder la protéine soluble et ne sont pas incorporés dans les filaments. L'inhibition proviendrait ainsi de la stabilisation de l'interaction entre l'extrémité C-terminale et la région des motifs de liaison aux microtubules ce qui garderait la protéine sous sa forme soluble^{73,77}. Les effets des extrémités C- et N-terminales sur la fibrillation sont donc antagonistes : le C-ter stabilise la protéine dans sa forme soluble tandis que le N-ter la stabilise dans une conformation apte pour la fibrillation (Fig. 16). *In vivo*, la phosphorylation de certains résidus permettrait de déstabiliser l'interaction C-ter/motifs R favorisant le repliement du N-ter sur les motifs R.

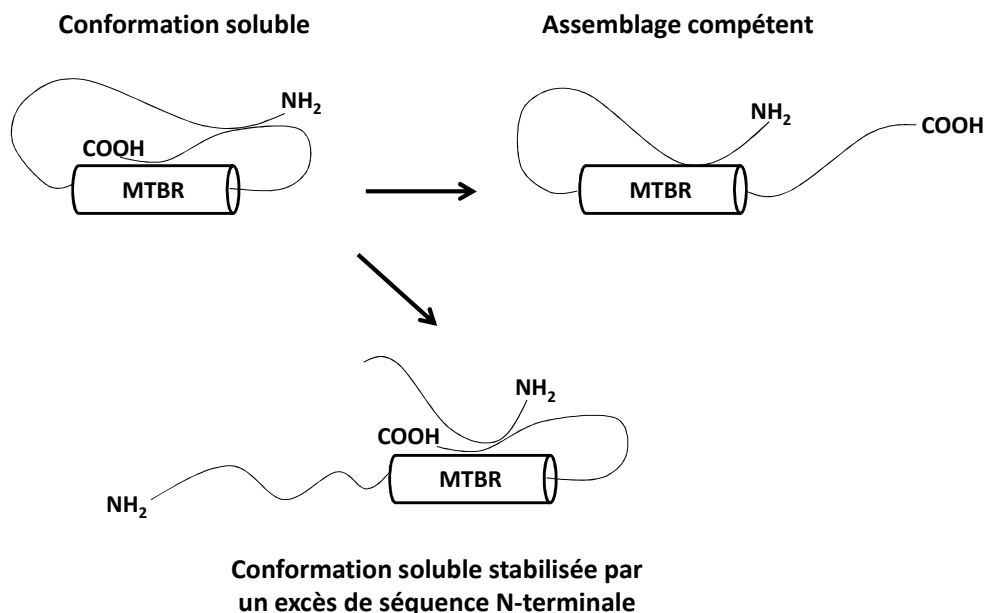


Fig. 16. Mécanisme de régulation de la fibrillation de la protéine tau par ses extrémités C- et N-terminales⁷⁷ (MTBR = Microtubules Binding Region)

I.1.5. Toxicité des fibres amyloïdes du peptide A β et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer

Bien que toutes les mutations génétiques impliquées dans la forme transmissible de la maladie d'Alzheimer concerne des perturbations de l'élaboration du peptide amyloïde, la relation entre l'accumulation de peptides A β et le déclin cognitif dans la

76.Horowitz, P. M.; LaPointe, N.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Berry, R. W.; Binder, L. I., N-terminal fragments of tau inhibit full-length tau polymerization in vitro. *Biochemistry* **2006**, 45 (42), 12859-12866.

77.LaPointe, N. E.; Horowitz, P. M.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Silva, A.; Andreadis, A.; Binder, L. I., Tau 6D and 6P isoforms inhibit polymerization of full-length tau in vitro. *Biochemistry* **2009**, 48 (51), 12290-12297.

maladie d'Alzheimer est un processus complexe non encore totalement élucidé. Une perte neuronale massive et une dystrophie des neurones sont observées^{9,13}. Cependant la formation de plaques amyloïdes atteint un plateau en général au moment où les symptômes permettent de diagnostiquer la maladie. L'exaltation des symptômes serait donc attribuée à d'autres acteurs tels que, par exemple des espèces solubles (oligomères, protofibrilles)¹⁹ ou l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) constituées de protéine tau. De plus, aucune maladie neurodégénérative présentant seulement des plaques amyloïdes n'a été décrite tandis que certaines démences sont attribuées uniquement à la protéine tau⁷⁸. La répartition et la progression des DNF dans le cortex sont davantage corrélées à l'apparition et l'évolution des symptômes que celles des plaques amyloïdes⁴⁶. Ces dernières sont également retrouvées chez des personnes âgées mais non atteintes de démence ce qui implique un rôle prédominant de la protéine tau dans la pathologie d'Alzheimer^{19,79}.

L'hypothèse de la cascade amyloïde a été proposée par Hardy et Selkoe au début des années 1990^{80,81,11}. Elle définit la maladie d'Alzheimer comme une amyloïdopathie, établissant que le peptide A β est la cause de la maladie. L'accumulation excessive et le dépôt du peptide A β entraînent une cascade complexe qui provoque les symptômes de la maladie. Ces événements initieraient les altérations des synapses, de la microglie et des astrocytes ainsi que la modification de la protéine tau conduisant à son agrégation. Cette cascade conduit finalement à la mort neuronale et à la défaillance des fonctions cognitives.

Il y a une vingtaine d'années, il était admis que les fibres amyloïdes étaient la cause des maladies à amyloses^{19,82}. Les plaques amyloïdes entourent les dystrophies des neurites (axones et dendrites), indiquant que les fibres amyloïdes pourraient être responsables des blessures neuronales^{82,83}. Aujourd'hui, plusieurs études montrent que les espèces intermédiaires de la fibrillation pourraient être toxiques^{19,24,84,85,86,87,88}.

78. Ballatore, C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q., Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8* (9), 663-672.

79. Ittner, L. M.; Götz, J., Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2010**, *12* (2), 67-72.

80. Hardy, J. A.; Higgins, G. A., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**.

81. Selkoe, D. J., The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **1991**, *6* (4), 487.

82. Fändrich, M., Oligomeric intermediates in amyloid formation: Structure determination and mechanisms of toxicity. *J. Mol. Biol.* **2012**.

83. Tsai, J.; Grutzendler, J.; Duff, K.; Gan, W.-B., Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7* (11), 1181-1183.

84. Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B., The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15* (3), 349-357.

85. Hartley, D. M.; Walsh, D. M.; Ye, C. P.; Diehl, T.; Vasquez, S.; Vassilev, P. M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J., Protofibrillar Intermediates of Amyloid β -Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons. *J. Neurosci.* **1999**, *19* (20), 8876-8884.

Plusieurs de ces espèces, telles que les ADDLs²⁴ ou les protofibrilles^{21,22}, n'ont pas encore été identifiées chez l'homme, alors que d'autres le sont^{26,86,89}. Cependant, l'implication des fibres dans de nombreuses amyloses systémiques est connue⁸². Ces pathologies sont associées à des dépôts de fibres amyloïdes dans le cœur, le foie et autres organes périphériques. Leur rigidité causerait des dommages physiques importants dans les tissus sans montrer pour autant de signes de toxicité et n'entraînant ainsi pas de réponse immunitaire envers ces dépôts. A l'inverse, les intermédiaires de fibrillation sont considérés comme toxiques dans plusieurs maladies neurologiques telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson ou dans des amyloses extra-cérébrales, telles que les amyloses transthyrétine ou amyline⁸². En effet, pour la maladie d'Alzheimer la sévérité des déficits cognitifs chez les patients atteints n'est pas corrélée avec le nombre de dépôts amyloïdes détectés dans le cerveau *post mortem*^{19,82}. Des altérations du métabolisme du peptide A β et la formation de plaques amyloïdes apparaissent plusieurs années avant les symptômes. Les mécanismes d'apprentissage et de la mémoire reposent sur la plasticité fonctionnelle et structurale des synapses. Ainsi, la perte de synapses semblerait un meilleur indicateur du déclin cognitif que le nombre ou la taille des dépôts amyloïdes^{19,88}. Dans les stades précoces de la maladie, ce serait plutôt l'accumulation d'espèces oligomériques solubles de peptide A β dans le cerveau qui serait neurotoxique et provoquerait la perte de neurones. Un équilibre entre plaques d'A β et oligomères d'A β pourrait aussi exister et dans ce cas les plaques seraient un réservoir à protéines anormalement repliées^{19,82}. Cet équilibre entre les fibres et les oligomères est connu. Il pourrait donc se produire autour des plaques provoquant un « débordement » d'espèces neurotoxiques. Des études *in vitro*^{21,24,84} et *in vivo*^{85,86,87} ont montré que les protofibrilles et les oligomères solubles perturbent la neurotransmission et peuvent causer la mort cellulaire. L'implication des espèces solubles d'A β est supportée par le fait que presque tous les oligomères induisent une synaptotoxicité quand ils sont appliqués à des coupes d'hippocampe, perturbent la neurotransmission dans des cultures de neurones, ou provoquent des déficits cognitifs et de la mémoire chez des rongeurs. Notamment, chez des souris transgéniques exprimant un mutant de l'APP, l'effet synaptotoxique a été

86.Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A., Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, *14* (8), 837-842.

87.Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J., Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **2002**, *416* (6880), 535-539.

88.Hémar, A.; Mulle, C., Maladie d'Alzheimer, peptide β -amyloïde et synapses Alzheimer's disease, amyloid peptide and synaptic dysfunction. *Med Sci (Paris)* **2011**, *27*, 733-736.

89.Pham, E.; Crews, L.; Ubhi, K.; Hansen, L.; Adame, A.; Cartier, A.; Salmon, D.; Galasko, D.; Michael, S.; Savas, J. N., Progressive accumulation of amyloid- β oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* **2010**, *277* (14), 3051-3067.

attribué à des espèces de peptides A β de 56 KDa ou A β *56²⁶. L'injection de ces espèces à de jeunes rats induit un déficit mnésique. Des oligomères extraits de cerveaux humains atteints de la maladie d'Alzheimer ont également été injectés à des singes qui développent par la suite la pathologie⁹⁰. Cependant le nombre d'animaux utilisés est trop faible pour conclure à la pathogénicité de l'amyloïde.

Il semblerait donc que la toxicité des oligomères causerait des altérations subtiles reflétant les premiers troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer, plutôt que la mort neuronale qui est observée à un stade plus tardif^{19,84,88}. La toxicité de l'A β serait un état transitoire, puis sa combinaison avec la pathologie de la protéine tau conduirait à la neurodégénérescence^{19,78,79,91}. Une autre possibilité serait que les modèles animaux ne représentent pas l'évolution de la maladie chez l'homme et que le dysfonctionnement et la perte neuronale seraient conduites par tau⁸⁴. *In vivo*, la toxicité des différentes espèces d'A β pourrait être due à sa liaison à d'autres acteurs cellulaires tels que les protéines ou les lipides membranaires, les récepteurs du glutamate ou de l'acétylcholine...^{84,88}

Bien qu'initialement les DNF étaient supposées être les premières espèces responsables de la toxicité, il est maintenant de plus en plus évident que les premières espèces toxiques sont des oligomères de tau^{79,92}. En effet, plusieurs études montrent que la seule présence de DNF n'induit pas de neurodégénérescence^{93,94}. Les oligomères de protéine tau sont des multimères de deux monomères ou plus. Ils peuvent être hyperphosphorylés et/ou non phosphorylés, solubles (pour ceux de petite taille) ou insolubles (pour ceux de taille élevée)⁷⁹. Ils ont été identifiés dans des cerveaux de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ou d'autres tauopathies à un stade précoce de la maladie d'après sa progression établie par Braak et Braak^{46,64,95,96,97}. Les

90. Baker, H.; Ridley, R.; Duchon, L.; Crow, T.; Bruton, C., Induction of β (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. *Mol. Neurobiol.* **1994**, *8* (1), 25-39.

91. Jin, M.; Shepardson, N.; Yang, T.; Chen, G.; Walsh, D.; Selkoe, D. J., Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (14), 5819-5824.

92. Meraz-Ríos, M. A.; Lira-De León, K. I.; Campos-Peña, V.; De Anda-Hernández, M. A.; Mena-López, R., Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *112* (6), 1353-1367.

93. Santacruz, K.; Lewis, J.; Spire, T.; Paulson, J.; Kotilinek, L.; Ingelsson, M.; Guimaraes, A.; DeTure, M.; Ramsden, M.; McGowan, E., Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **2005**, *309* (5733), 476-481.

94. Le Corre, S.; Klafki, H. W.; Plesnila, N.; Hübinger, G.; Obermeier, A.; Sahagún, H.; Monse, B.; Seneci, P.; Lewis, J.; Eriksen, J., An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (25), 9673-9678.

95. Maeda, S.; Sahara, N.; Saito, Y.; Murayama, S.; Ikai, A.; Takashima, A., Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.* **2006**, *54* (3), 197-201.

96. Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Sengupta, U.; Sarmiento, J.; Troncoso, J.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2012**, *26* (5), 1946-1959.

oligomères de tau sont neurotoxiques pour des neurones en cultures et altèrent la perméabilité membranaire⁹⁸. De plus, il a été montré que la perte neuronale et les lésions synaptiques commencent avant la formation de DNF chez plusieurs souris modèles de tauopathies⁹⁹. Par exemple, Berger et al⁹⁹ ont caractérisé des oligomères de 140 KDa et 170 KDa à partir de souris modèles. Le taux de ces multimères est corrélé à la perte de mémoire à plusieurs âges. Enfin, une étude récente utilisant des échantillons de cerveaux humains atteints de la maladie d'Alzheimer, a permis d'estimer que le taux d'oligomères solubles est quatre fois supérieur à celui trouvé dans des cerveaux non atteints et qu'ils se situent dans les régions cérébrales où a lieu la mort neuronale.

La relation entre la protéine tau et le peptide A β n'est pas encore totalement élucidée⁷⁹. Comme nous l'avons énoncé ci-dessus, les oligomères d'A β seraient responsables principalement du dysfonctionnement neuronal dans l'hippocampe et causeraient les déficits mnésiques. Le débat actuel est de savoir si les oligomères d'A β induisent l'altération de la phosphorylation de tau, les changements dans le cytosquelette et la dégénérescence des neurites⁷⁹. Dans l'hypothèse de la cascade amyloïde, la formation de peptides A β est l'étape clé conduisant à la maladie d'Alzheimer. La question est de savoir où se place la protéine tau dans cette cascade⁷⁹. Est-ce la première cible, un médiateur ou un spectateur de la toxicité de l'A β ? Bien que les deux acteurs exercent leur toxicité selon des mécanismes différents, des modèles *in vitro* et *in vivo* suggèrent plusieurs possibilités d'interaction entre les deux (Fig. 17).

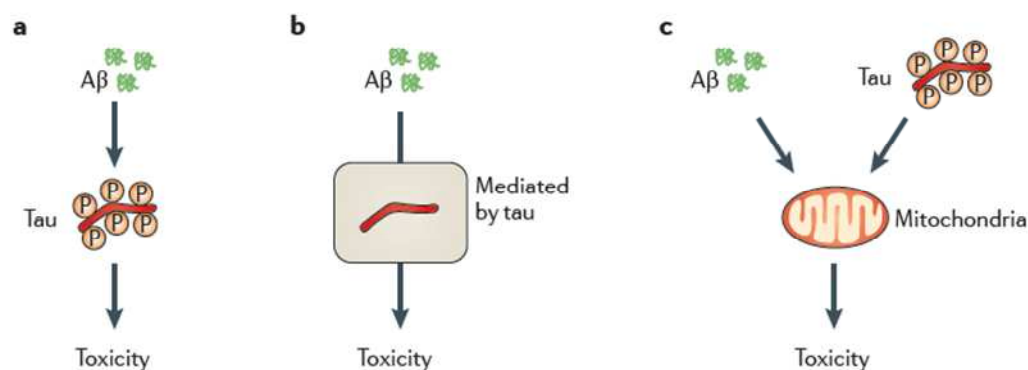


Fig. 17. Les trois modes d'interaction possibles tau/A β ⁷⁹ : a) L'A β induit la pathologie de tau b) La toxicité de tau induit la toxicité de l'A β c) Effet synergique de tau et A β

97.Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Sengupta, U.; Guerrero-Munoz, M. J.; Kiritoshi, T.; Neugebauer, V.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci. Rep.* **2012**, *2*.

98.Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Guerrero-Munoz, M. J.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Preparation and Characterization of Neurotoxic Tau Oligomers. *Biochemistry* **2010**, *49* (47), 10039-10041.

99.Berger, Z.; Roder, H.; Hanna, A.; Carlson, A.; Rangachari, V.; Yue, M.; Wszolek, Z.; Ashe, K.; Knight, J.; Dickson, D., Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.* **2007**, *27* (14), 3650-3662.

Le peptide A β pourrait provoquer la pathologie de tau notamment en induisant son hyperphosphorylation (Fig. 17 a). Jin et al⁹¹ ont montré récemment que des dimères d'A β , extraits de cerveaux humains atteints d'Alzheimer, peuvent induire à des concentrations inférieures au nanomolaire la phosphorylation de la protéine tau dans des neurones hippocampiques. Ils causent ensuite la destruction du cytosquelette et la dégénérescence des neurites, le tout en absence de fibres amyloïdes. Les mêmes résultats ont été obtenus chez des souris transgéniques. De plus, l'immunisation contre le peptide A β de souris triple transgéniques, qui possèdent des plaques amyloïdes et des DNF, permet de diminuer la quantité de protéine tau hyperphosphorylée¹⁰⁰. Une autre possibilité serait que la protéine tau est un médiateur de la toxicité du peptide A β ^{93,101,102} (Fig. 17 b). Ceci est supporté par le fait que des souris transgéniques APP et déficientes en protéine tau sont protégées en partie de la toxicité du peptide A β ^{93,101,102}. Enfin, les toxicités de tau et d'A β auraient des effets synergiques sur certaines cibles dans la cellule, amplifiant les effets de l'un et l'autre (Fig. 17 c). Par exemple, chez des souris transgéniques exprimant tau et A β , la respiration mitochondriale est fortement altérée par rapport aux souris n'exprimant que l'un ou l'autre¹⁰³. Le mode d'action de chacun est différent, en ciblant des complexes mitochondriaux différents, ce qui résulte en une forte déficience du système.

Une hypothèse alternative à celle de la cascade amyloïde a été proposée (Fig. 18)⁷⁹ selon laquelle l'augmentation de la protéine tau dans les dendrites rend les neurones plus vulnérables à la toxicité de l'A β . Contrairement à la cascade amyloïde, cette nouvelle proposition prend en compte le lien entre le peptide A β et la protéine tau. En effet, la toxicité du peptide A β est liée à la protéine tau et l'exposition prolongée des neurones aux peptides A β a de multiples effets toxiques, dont l'hyperphosphorylation de la protéine tau.

100.Oddo, S.; Billings, L.; Kesslak, J. P.; Cribbs, D. H.; LaFerla, F. M., A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **2004**, *43* (3), 321-32.

101.Roberson, E. D.; Scarce-Levie, K.; Palop, J. J.; Yan, F.; Cheng, I. H.; Wu, T.; Gerstein, H.; Yu, G.-Q.; Mucke, L., Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Sci Signal* **2007**, *316* (5825), 750.

102.Ittner, L. M.; Ke, Y. D.; Delerue, F.; Bi, M.; Gladbach, A.; van Eersel, J.; Wölfling, H.; Chieng, B. C.; Christie, M. J.; Napier, I. A., Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **2010**, *142* (3), 387-397.

103.Rhein, V.; Song, X.; Wiesner, A.; Ittner, L. M.; Baysang, G.; Meier, F.; Ozmen, L.; Bluethmann, H.; Dröse, S.; Brandt, U., Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (47), 20057-20062.

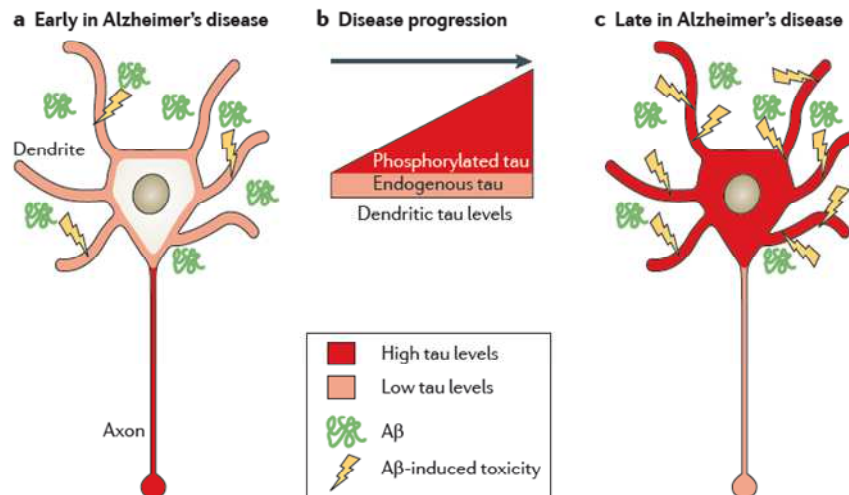


Fig. 18. Hypothèse axée sur la protéine tau de la maladie d'Alzheimer⁷⁹

Physiologiquement, la protéine tau est principalement localisée dans les axones des neurones. Lorsqu'elle s'agrège dans la maladie d'Alzheimer elle se délocalise dans les dendrites. L'hypothèse axée sur la protéine tau propose que la formation du peptide Aβ initierait la maladie (Fig. 18 a) puis lors de sa progression, induirait la phosphorylation de tau entraînant l'accumulation de celle-ci dans les dendrites (Fig. 18 b). Cette localisation de la protéine corrèle avec la vulnérabilité du compartiment post-synaptique des neurones aux peptides Aβ dans les stades plus avancés de la pathologie (Fig. 18 c).

I.1.6. Diagnostic et traitement de la maladie d'Alzheimer

I.1.6.1. La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)

L'administration de médicaments ou d'agents diagnostiques dans le cerveau nécessite qu'ils passent la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière est une protection du système nerveux central (SNC) en empêchant la pénétration de substances nocives pour cet organe¹⁰⁴. Elle permet la régulation de l'homéostasie cérébrale. La BHE est constituée principalement de cellules endothéliales cérébrales qui forment des jonctions serrées (Fig. 19) limitant le transport par diffusion passive de grosses molécules et de molécules hydrophiles. Elle est également composée de péricytes (cellules musculaires lisses) et de pieds astrocytaires.

104.Gosselet, F.; Candela, P.; Cecchelli, R.; Fenart, L., La barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)* **2011**, 27 (11), 987.

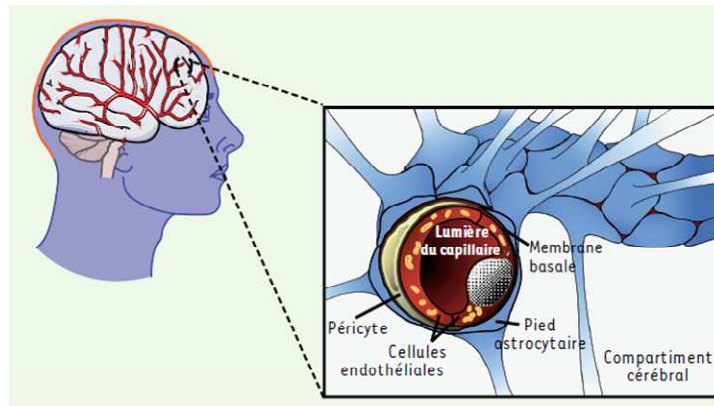


Fig. 19. Représentation schématique de la BHE localisée au niveau des capillaires cérébraux¹⁰⁴

La BHE, de par sa structure, permet un contrôle rigoureux des échanges entre le sang et le SNC. Deux voies de transport sont possibles à travers cette barrière :

- La diffusion passive à travers la bicouche lipidique qui se limite aux molécules hydrophobes de faible masse moléculaire (<500 KDa). Ce mécanisme est spontané et non-saturable.
- Le passage *via* des transporteurs et des récepteurs spécifiques (Fig. 20). Par exemple il existe des transporteurs spécifiques pour le glucose et les acides aminés, ainsi que des récepteurs pour les molécules de haute masse moléculaire (protéines, lipoprotéines...). Ce mécanisme est saturable.

La BHE est donc une barrière physique pour le passage des molécules et des agents pathogènes mais également une barrière métabolique. En effet, des enzymes sont exprimées en intra et extracellulaire des cellules endothéliales cérébrales et permettent la dégradation de substrats nocifs pour le cerveau. La présence de pompes d'efflux limite aussi le passage de certaines substances et facilite leur élimination.

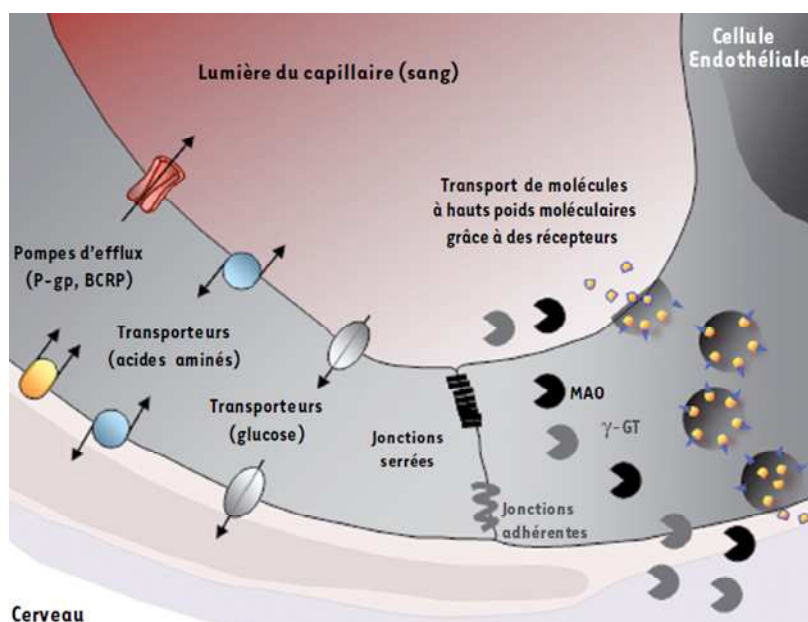


Fig. 20. La BHE est une barrière physique et métabolique¹⁰⁴

Traverser la BHE est donc un véritable défi en thérapie. Plusieurs stratégies sont utilisées pour l'administration cérébrale des molécules en thérapie ou pour le diagnostic^{105,106} : l'utilisation de molécules combinant un principe actif et une molécule transporteur, l'administration par voie intra-nasale ou par des méthodes plus invasives telles que l'administration intracraniale ou l'altération temporaire de la BHE par perturbation osmotique.

Une de ces stratégies, par exemple, consiste à greffer sur le composé d'intérêt un élément de ciblage des transporteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales. Des systèmes appelés « chevaux de Troie » (Trojan horse) ont également été développés. Dans ces systèmes une molécule connue pour traverser la BHE est couplée à la molécule d'intérêt. Des peptides facilitant le passage membranaire appelés cell penetrating peptides (CPP) peuvent être couplés à la molécule d'intérêt¹⁰⁷. Le composé biologiquement actif peut aussi être attaché à une molécule servant de transporteur pour le passage de la BHE. Notamment, Foucrot et al¹⁰⁸ ont montré l'intérêt d'utiliser des dérivés 1,4-dihydroquinoline pour faciliter le passage à travers la BHE de l'acide γ-

105.(a) Banks, W. A., Drug transport into the central nervous system: using newer findings about the blood-brain barriers. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2012**, 2 (3), 152-159; (b) Banks, W. A., Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood-brain barrier. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, 64 (7), 629-639.

106.Chen, Y.; Liu, L., Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, 64 (7), 640-665.

107.Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G., Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157 (2), 195-206.

108.Foucrot, L.; Gourand, F.; Dhilly, M.; Bohn, P.; Dupas, G.; Costentin, J.; Abbas, A.; Marsais, F.; Barré, L.; Levacher, V., Synthesis, radiosynthesis and biological evaluation of 1, 4-dihydroquinoline derivatives as new carriers for specific brain delivery. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (18), 3666-3673.

butyrique (GABA). Un bras possédant une fonction ester ou une fonction amide a été préalablement introduit sur le cycle 1,4-dihydroquinoline. Celui-ci permet de lier le GABA au transporteur et pourra être coupé *in vivo* par des enzymes (estérases ou amidases) afin de libérer la molécule d'intérêt pour qu'elle agisse sur sa cible. Les résultats obtenus chez le rat et la souris sont prometteurs et montrent le potentiel des composés 1,4-dihydroquinoline en tant que transporteurs pour délivrer des molécules dans le système nerveux central. Par la suite la même équipe a montré que ce système de délivrance permet l'entrée cérébrale chez le rat de la *meta*-iodobenzylguanidine (MIBG) qui est utilisé pour la détection de tumeurs en imagerie¹⁰⁹. Enfin, un dernier exemple est celui de l'utilisation de nanoparticules qui servent de vecteurs pour le passage de la BHE^{110,111}.

1.1.6.2. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est difficile et n'est définitivement établi que *post mortem* lors de l'autopsie^{9,112}. En effet, la maladie d'Alzheimer se définit par l'association d'un syndrome démentiel progressif et par la présence de lésions cérébrales : les plaques amyloïdes et les DNF. Ainsi le diagnostic est réalisé principalement par un examen clinique qui reflète l'état cognitif et mental du patient. Actuellement, peu de biomarqueurs sont disponibles et leur efficacité est modérée. Le diagnostic est donc probabiliste et il est établi avec certitude à la mort du patient par un examen anatomo-pathologique permettant de quantifier les lésions du tissu cérébral^{9,112}.

L'examen clinique est réalisé à partir de critères dont les plus utilisés sont ceux du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux (DSM-IV, American Psychiatric Association, 1994) et du National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ARDRA 1984)^{9,112}. Les critères DSM-IV concernent le diagnostic des démences en général. Le syndrome démentiel est détecté par :

- L'apparition, l'évolution progressive et continue de plusieurs déficits cognitifs dont l'altération de la mémoire et au moins d'une des suivantes : aphasie (perte de la parole), apraxie (incapacité à effectuer des mouvements), agnosie (atteinte des fonctions sensorielles), perturbation des fonctions exécutives.

109. Gourand, F.; Mercey, G.; Ibazizène, M. z.; Tirel, O.; Henry, J.; Levacher, V.; Perrio, C.; Barré, L., Chemical delivery system of metaiodobenzylguanidine (MIBG) to the central nervous system. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (3), 1281-1287.

110. Kreuter, J., Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**.

111. Liu, Z.; Gao, X.; Kang, T.; Jiang, M.; Miao, D.; Gu, G.; Hu, Q.; Song, Q.; Yao, L.; Tu, Y., B6 peptide-modified PEG-PLA nanoparticles for enhanced brain delivery of neuroprotective peptide. *Bioconjugate Chem.* **2013**.

112. Rigaud, A.-S.; Forette, F., Maladie d'Alzheimer: vision d'ensemble, aspects cliniques, facteurs de risque et prévention Alzheimer's disease: overview, risk factors and prevention. *Med Sci (Paris)* **2002**, 18, 689-696.

- Un retentissement dans les activités de la vie quotidienne.

Les critères NINCDS-ADRDA permettent d'établir un diagnostic probabiliste c'est-à-dire de classer la maladie d'Alzheimer entre possible, probable ou certaine¹¹². Ils associent les critères DSM-IV à des examens neuropsychologiques et psychiatriques. Plusieurs outils sont disponibles pour évaluer l'atteinte des fonctions (de l'autonomie) et les troubles du comportement et éventuellement un état dépressif. Ces outils correspondent à des entretiens avec le patient et des tests cognitifs. Le choix des tests utilisés est laissé à l'appréciation du praticien. La principale difficulté consiste à écarter les autres démences telles qu'une démente des corps de Lewy ou une maladie de Parkinson. Le diagnostic clinique réalisé à partir des critères DSM-IV et NINCDS-ADRADA permet de détecter une maladie d'Alzheimer probable avec une sensibilité plutôt satisfaisante de l'ordre de 81% et avec une spécificité de 70%¹¹³. Cependant il existe toujours un retard de diagnostic (environ 24 mois en France). L'apparition des symptômes est souvent sous-estimée. Chez les sujets jeunes (moins de 65 ans) ils sont mis sur le compte de la fatigue et les pertes de mémoires sont banalisées. Chez les sujets âgés (plus de 65 ans) les symptômes sont attribués à la vieillesse. De plus, en général le patient a du mal à évaluer ses propres performances. Il existe donc un sous-diagnostic de la pathologie et seulement 50% des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer seraient diagnostiquées en France. De nouvelles stratégies de diagnostic sont proposées pour permettre une prise en charge plus spécifique. Dubois et al¹¹⁴ mettent en avant le fait que les critères cités ci-dessus sont anciens (1984) et que de nombreux aspects morphologiques de la pathologie étaient alors inconnus. Ainsi, ces chercheurs proposent d'ajouter de nouveaux critères biologiques et morphologiques pour affiner l'examen clinique.

Bien que l'imagerie et le dosage de biomarqueurs ne permettent pas encore d'établir un diagnostic certain de la maladie d'Alzheimer, des avancées dans ce domaine ont été faites et certains outils biologiques sont actuellement disponibles.

Des marqueurs biologiques peuvent être dosés dans le LCR (liquide céphalorachidien)¹¹⁵. Trois marqueurs en particulier se distinguent : le peptide A β ₄₂, les

113. Knopman, D.; DeKosky, S. T.; Cummings, J.; Chui, H.; Corey-Bloom, J.; Relkin, N.; Small, G.; Miller, B.; Stevens, J., Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review) Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2001**, *56* (9), 1143-1153.

114. Dubois, B.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; Cummings, J. L.; DeKosky, S. T.; Barberger-Gateau, P.; Delacourte, A.; Frisoni, G.; Fox, N. C.; Galasko, D., Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* **2010**, *9* (11), 1118-1127.

115. (a) Craig-Schapiro, R.; Fagan, A. M.; Holtzman, D. M., Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *35* (2), 128-140; (b) Blennow, K.; Zetterberg, H.; Fagan, A. M., Fluid Biomarkers in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2* (9).

protéines tau totales et phosphorylées (ptau). La diminution de peptide A β ₄₂ dans le LCR serait due à une augmentation de son accumulation dans les dépôts amyloïdes et permettrait ainsi de mettre en évidence la progression de la maladie. L'augmentation de protéines tau totales dans le LCR serait corrélée à l'évolution croissante de l'atteinte neuronale par le biais de la formation de DNF. Lors du développement de la pathologie la protéine tau est protéolysée et le test enzymatique effectué dans le LCR permet de détecter ces fragments de tau. Enfin, la protéine tau est également anormalement phosphorylée dans la maladie d'Alzheimer. La détection de ces formes pathologiques de la protéine met en évidence une augmentation de leur quantité dans le LCR. La présence de deux marqueurs sur trois chez un patient au stade léger ou modéré de démence permettent de déterminer s'il va progresser ou pas vers une maladie d'Alzheimer. La présence des trois marqueurs permettrait d'établir un diagnostic de la pathologie avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 87%¹¹⁶. Cependant le dosage de biomarqueurs est limité au stade de démence modérée alors que l'objectif serait de pouvoir réaliser un diagnostic au stade pré-démence de la maladie.

Depuis une dizaine d'années, la neuro-imagerie est de plus en plus employée pour l'étude de la maladie d'Alzheimer^{117,118}. Elle permet d'aider à l'établissement d'un diagnostic et d'exclure la présence d'autres pathologies sous-jacentes¹¹⁴. Les images du cerveau sont aussi un moyen de mesurer l'évolution de la maladie au cours du temps, notamment dans le cadre des études thérapeutiques évaluant de nouvelles molécules. Enfin, elles permettent d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Deux méthodes d'imagerie sont principalement utilisées pour suivre la maladie d'Alzheimer : l'imagerie nucléaire (TEP ou TEMP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM)^{117,118}.

L'IRM mesure le signal électromagnétique émis par certains atomes lorsqu'un champ magnétique est appliqué. Ce signal varie en fonction du tissu et permet de reconstruire des images en 2D et 3D de l'intérieur d'un corps. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une atrophie de l'hippocampe. Cette atrophie évolue avec la sévérité de la maladie d'Alzheimer et se superpose aux lésions provoquées par les DNF. L'IRM caractérise et quantifie la densité et le volume de la substance grise *in vivo*. Cela permet d'accéder aux profils d'atrophie des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

116. Hansson, O.; Zetterberg, H.; Buchhave, P.; Londos, E.; Blennow, K.; Minthon, L., Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* **2006**, 5 (3), 228-234.

117. (a) Ewers, M.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E.; Weiner, M. W.; Hampel, H., Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia. *Trends Neurosci.* **2011**, 34 (8), 430-442; (b) Johnson, K. A.; Fox, N. C.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E., Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, 2 (4).

118. Chételat, G., La neuro-imagerie au service de la maladie d'Alzheimer. *Med Sci (Paris)* **2011**, 27, 193-198.

L'atrophie de l'hippocampe chez ces patients mesurée par IRM est estimée entre 20 et 52% par rapport à des sujets sains. Même si l'atrophie prédomine au niveau de l'hippocampe, elle s'étend ensuite à d'autres structures cérébrales. Cette technique permettrait de distinguer les sujets sains de ceux atteints de troubles cognitifs modérés et de ceux atteints de la maladie d'Alzheimer. Les études en IRM ont mis en évidence des altérations des connexions dans cette maladie dans plusieurs zones cérébrales.

L'imagerie nucléaire est une technique d'imagerie moléculaire qui repose sur le suivi et l'analyse de la répartition dans l'organisme de molécules marquées avec un isotope radioactif préalablement administrées au patient^{115a,117,118}. Elle informe sur le fonctionnement cérébral par la mesure du métabolisme de base. Ces marqueurs peuvent être spécifiques d'une cible, d'une fonction ou d'un processus physiologique particulier. Selon l'isotope radioactif choisi, deux modalités d'imagerie nucléaire peuvent être employées : la TEP (Tomographie par Emission de Positons) et la TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique). Ces techniques permettent de réaliser soit une étude fonctionnelle soit une étude moléculaire de la pathologie.

Deux radiotraceurs sont utilisés pour les études fonctionnelles de la maladie d'Alzheimer : le ^{18}F -FDG (2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose) qui marque la consommation cérébrale de glucose ou la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexaméthylpropylène-amineoxime) qui marque le débit sanguin. Ces composés permettent de mettre en évidence l'hypométabolisme pour le ^{18}F -FDG et l'hypoperfusion pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO qui sont des modifications fonctionnelles qui ont lieu dans certaines structures cérébrales chez des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer^{117,118,119}. L'hypométabolisme mesuré en TEP-FDG touche le cortex cingulaire postérieur (le premier touché), le cortex temporo-pariétal puis des régions frontales avec l'avancée de la maladie. Contrairement à l'atteinte anatomique détectée en IRM, l'atteinte fonctionnelle semble toucher l'hippocampe de façon plus modérée et plus tardivement. Cette différence ou « paradoxe hippocampique », reflète la plasticité (sa capacité à s'adapter et répondre à l'agression) de l'hippocampe. L'hypométabolisme du cortex cingulaire postérieur indiquerait un phénomène de diaschisis qui est un effet à distance de l'atrophie hippocampique provoquant une baisse d'activité au niveau des projections axonales de cette structure. Le ^{18}F -FDG présente une sensibilité estimée supérieure à 90% et une spécificité à plus de 70%¹²⁰. Les données pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO sont plus variables avec des performances allant de 74 à 92% pour la distinction de patients atteints de la maladie d'Alzheimer de

119.Dougall, N. J.; Bruggink, S.; Ebmeier, K. P., Systematic review of the diagnostic accuracy of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-SPECT in dementia. *American Journal of Geriatric Psych* **2004**, 12 (6), 554-570.

120.Small, G., What does imaging add to the management of Alzheimer's disease? *CNS spectrums* **2004**, 9 (7 Suppl 5), 20.

sujets sains¹¹⁹. En effet, bien que l'atrophie hippocampique soit le marqueur le plus souvent associé à la maladie d'Alzheimer en neuro-imagerie, il n'est pas totalement fiable. L'atrophie de l'hippocampe se retrouve dans le vieillissement normal et dans d'autres pathologies. Les résultats obtenus avec le ¹⁸F-FDG sont prometteurs pour l'établissement d'un diagnostic précoce de cette maladie.

L'étude moléculaire par imagerie nucléaire utilise des radiotraceurs afin de visualiser les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, en particulier les plaques amyloïdes et les DNF qui jusqu'alors n'étaient identifiables que *via* des analyses *post mortem*. Ces traceurs seront décrits ultérieurement dans la partie II.5.1.1.

1.1.6.3. Traitement de la maladie d'Alzheimer

A. Traitements symptomatiques

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer. Les seuls traitements disponibles sont symptomatiques. Ces derniers permettent seulement de réduire les symptômes de la maladie qui sont principalement des symptômes psychologiques et comportementaux. Ces traitements comprennent des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et un antagoniste du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate)^{121,122,123}.

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) sont la première classe de produits approuvée par la FDA (the US Food and Drug Administration) dans le traitement des formes légères à sévères de la maladie d'Alzheimer^{121,122}. Dans cette pathologie, une réduction de la production de choline, de la libération de l'Ach et une perte progressive des neurones cholinergiques sont observées. Ainsi, il a été supposé que d'empêcher la dégradation de l'acétylcholine (Ach) et donc d'augmenter son taux dans les synapses permettrait d'améliorer la mémoire et diminuer l'altération des fonctions cognitives chez les patients atteints d'Alzheimer. Deux enzymes sont principalement responsables de l'hydrolyse de l'Ach : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BuChE). Trois inhibiteurs de l'AChE (Fig. 21), approuvés par la FDA sont utilisés actuellement en thérapie : le donepezil (ou Aricept®) depuis 1996, la rivastigmine (Exelon®) depuis 2000, la galantamine (Reminyl®, Razadyne®) depuis 2001. Le donepezil et la galantamine sont des inhibiteurs de l'AChE qui permettent d'améliorer et de maintenir les fonctions cognitives

121.Hong-Qi, Y.; Zhi-Kun, S.; Sheng-Di, C., Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Aβ and tau. *Transl Neurodegener* **2012**, 1 (1), 1-12.

122.Aisen, P. S.; Cummings, J.; Schneider, L. S., Symptomatic and Nonamyloid/Tau Based Pharmacologic Treatment for Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, 2 (3).

123.Citron, M., Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9 (5), 387-398.

ainsi que les activités de la vie quotidienne. La rivastigmine inhibe l'AChE et la BuChE ce qui résulte en une amélioration de la cognition. Le donepezil et la rivastigmine affectent également l'APP ce qui impliquerait un mécanisme *in vivo* moins simpliste que l'inhibition seule des enzymes de dégradation de l'Ach.

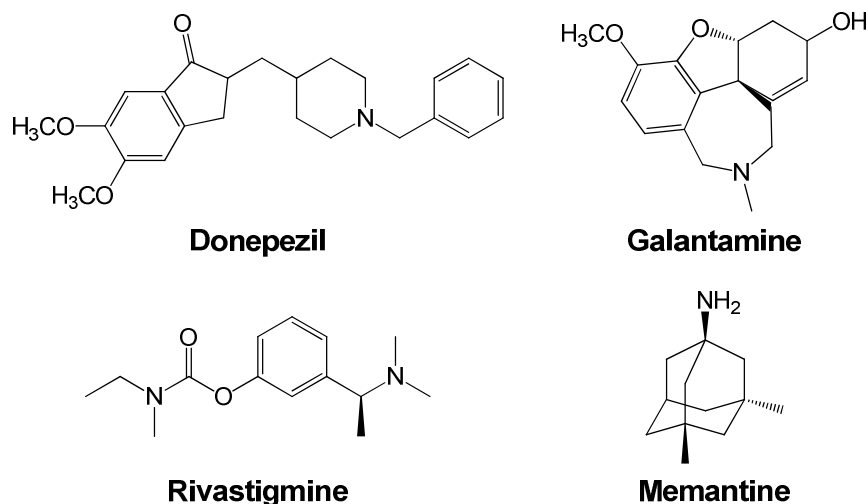


Fig. 21. Structures des composés commerciaux pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

La mémantine (Fig. 21), approuvée par la FDA en 2004, est un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate^{121,122}. Le glutamate (neurotransmetteur) est impliqué dans les voies associées à l'apprentissage et la mémoire. L'altération de la mémoire pourrait ainsi être provoquée par des niveaux élevés de glutamate retrouvés dans les cerveaux atteints d'Alzheimer. Les effets de la mémantine sont similaires à ceux observés avec les inhibiteurs de l'AChE. L'addition de ce traitement chez des patients recevant déjà le donepezil permet une amélioration des fonctions cognitives.

B. Stratégies thérapeutiques ciblant le peptide Aβ

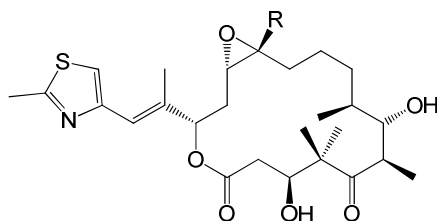
Plusieurs stratégies thérapeutiques sont envisagées pour cibler le peptide β-amyloïde soit en diminuant sa production, soit en augmentant sa clairance ou soit en prévenant son agrégation^{121,123,124}. Ainsi, des inhibiteurs des enzymes β et γ-sécrétases sont développés pour diminuer voire empêcher la production de peptides Aβ à partir de l'APP (précurseur du peptide Aβ). Des modulateurs/activateurs de l'enzyme α-sécrétase sont également envisagés afin d'augmenter la production de la sAPPα, qui n'est pas amylogène, par rapport à celle de peptides Aβ. Afin d'augmenter la clairance des peptides Aβ, des activateurs des apolipoprotéines (ApoE) ont été développés. En effet, il a été montré que les personnes possédant l'allèle de l'ApoE4 ont un risque élevé de développer

124. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M., Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet neurology* **2010**, 9 (7), 702.

une forme sporadique tardive d'Alzheimer. En revanche l'activation de l'ApoE2 permet d'augmenter la dégradation de l'Aβ. Les récepteurs RAGE (Receptors for advanced glycation end products), présents dans les parois des vaisseaux sanguins, permettent aux peptides Aβ de passer la BHE et facilitent leur accumulation dans le cerveau. L'inhibition de l'interaction RAGE-Aβ dans des modèles de souris permet de diminuer l'accumulation d'Aβ dans le cerveau. Ces deux dernières stratégies nécessitent d'être explorées cliniquement. Enfin, des agents ciblant l'agrégation des peptides Aβ ont été testés. Le tamiprosate (Alzhemed), se lie aux formes solubles d'Aβ et empêche la formation d'espèces neurotoxiques. Cependant, les résultats obtenus en phase clinique III n'étaient pas satisfaisants, les essais ont été abandonnés. D'autres composés sont en cours d'étude.

C. Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau

Plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau sont étudiées^{122,124,125}. Des inhibiteurs des enzymes responsables de la phosphorylation ont été développés. Cependant les premières études cliniques ne sont pas concluantes. En effet, ces enzymes possèdent plusieurs substrats du métabolisme cellulaire, ce qui peut entraîner l'altération de plusieurs fonctions physiologiques et rendre difficile l'utilisation d'inhibiteurs chez l'homme. Afin de compenser la perte neuronale observée dans les tauopathies, l'utilisation d'agents stabilisant les microtubules semble prometteuse. En effet, de tels composés étant utilisés pour traiter le cancer, leur toxicité et leur biodisponibilité sont bien établies. Notamment, l'épothilone (EpoD) a permis de stabiliser les microtubules et améliorer les fonctions cognitives dans des modèles de souris de tauopathies (Fig. 22). De plus sa capacité à passer la BHE et son efficacité pour le traitement du cancer, en font la molécule la plus apte pour de futurs essais cliniques.



Epothilone A R=H
Epothilone B R=CH₃

Fig. 22. Structures de l'épothilone

Inhiber l'agrégation de tau est une autre stratégie possible. Plusieurs composés inhibant la fibrillation de la protéine ont été découverts *in vitro* et sont en études

125. Himmelstein, D. S.; Ward, S. M.; Lancia, J. K.; Patterson, K. R.; Binder, L. I., Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacol. Ther.* **2012**.

précliniques à l'exception du bleu de méthylène. Ce dernier, déjà bien connu et utilisé en clinique (neuroleptique, antiseptique...) a atteint la phase III en étude clinique^{125,126}. Les résultats sont encourageants bien que son mécanisme d'action *in vivo* ne soit pas totalement connu. En effet ce composé agit sur plusieurs cibles. Par exemple, il inhibe également l'oligomérisation et l'agrégation des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ respectivement. Le bleu de méthylène est aussi un inhibiteur connu de l'AChE¹²⁶.

D. Immunothérapie

Une autre approche visant la clairance du peptide A β est l'immunothérapie qui peut être active (vaccination) ou passive (anticorps monoclonal)^{123,124,127}. Ces stratégies ont permis de diminuer le taux d'A β , de plaques amyloïdes et/ou permettent une amélioration des fonctions cognitives chez des modèles de souris. Ceci a conduit à des essais cliniques chez l'homme. L'immunothérapie active consiste à injecter le peptide A β entier ou un fragment de peptide A β afin d'induire une réponse immunitaire chez le patient. L'AN1792 est un peptide A β synthétique et a été le premier testé en clinique. Cependant ce composé a échoué en phase II des études cliniques car des encéphalites ont été développées chez certains patients. Les autopsies de certains patients ayant développés des anticorps après avoir reçu l'AN1792 et dont le décès n'était pas relié à un problème neurologique, ont montré une diminution des dépôts amyloïdes dans leur cortex et une bonne clairance des peptides A β possédant une extrémité N-terminale intacte. Cependant des patients présentent des symptômes de démence à un stade avancé malgré la diminution des dépôts amyloïdes. De nouveaux vaccins ont ensuite été développés et les méthodes d'administration ou les adjuvants ajoutés ont été étudiés pour diminuer les effets secondaires (inflammation provoquant les encéphalites). Actuellement ces composés sont testés en clinique comme l'ACC-001 (vanutide cridificar) qui résulte de la conjugaison de plusieurs peptides A β ₁₋₇ avec un variant non-toxique de la toxine diphtérique. L'immunothérapie passive, consistant à injecter des anticorps monoclonaux, est également testée en clinique. Un plus grand nombre d'injections est nécessaire par rapport à l'immunothérapie active. Bapineuzumab est un anticorps monoclonal humain ciblant la partie N-terminale de l'A β qui est actuellement en phase III d'étude clinique. Il permet de retarder le déclin des fonctions cognitives au moins pour une partie des patients. Bien que l'immunisation active permette de garder un taux constant d'anticorps, il est difficile de réduire leur nombre en cas d'effets secondaires. De plus, certains patients, notamment les plus âgés ne développent pas les anticorps suite à la vaccination. L'immunisation passive en revanche permet de cibler plus spécifiquement

126.Oz, M.; Lorke, D. E.; Petroianu, G. A., Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, 78 (8), 927-932.

127.Lobello, K.; Ryan, J. M.; Liu, E.; Rippon, G.; Black, R., Targeting Beta Amyloid: A Clinical Review of Immunotherapeutic Approaches in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 2012.

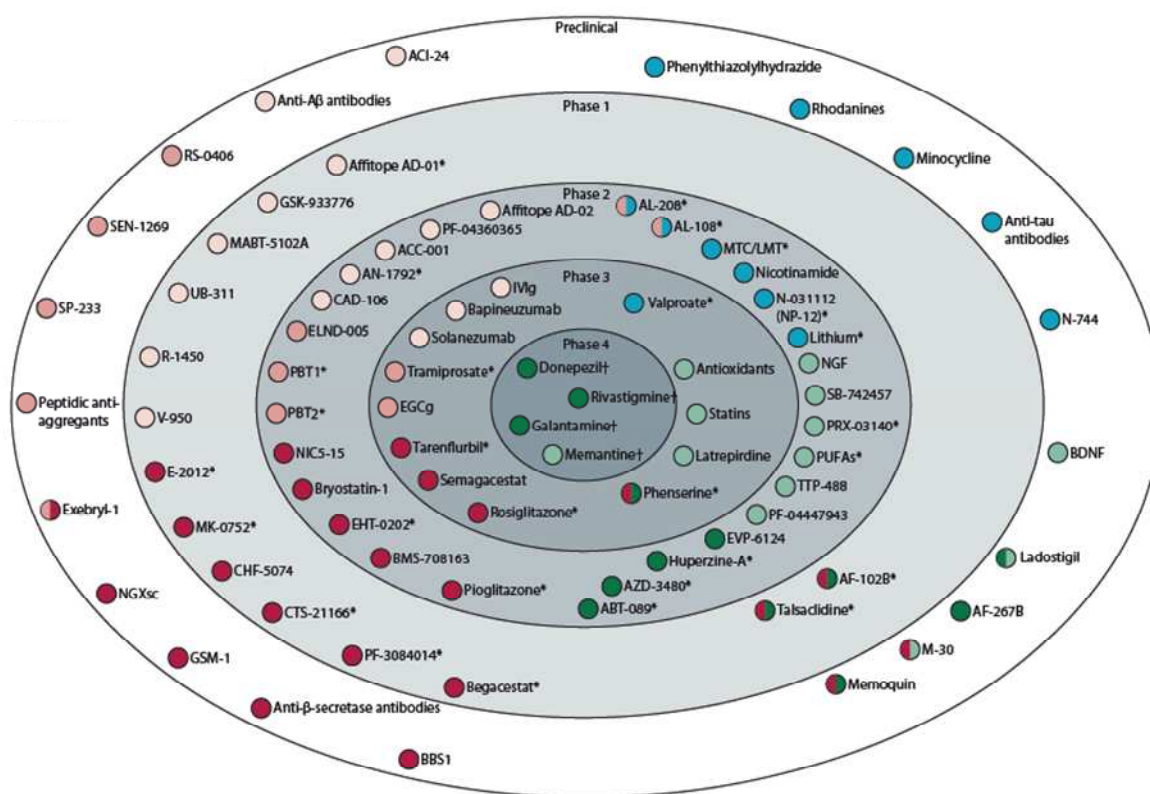
des épitopes de l'Aβ, permet de mieux contrôler la titration des anticorps et pourrait être plus efficace chez les personnes âgées. Cependant son coût est élevé et les effets secondaires pourraient être plus importants que ceux observés avec l'immunisation active.

Les résultats intéressants obtenus avec l'immunothérapie pour le peptide Aβ ont incité à appliquer cette stratégie pour augmenter la clairance de la protéine tau^{121,125}. Cependant les études dans ce domaine sont beaucoup moins avancées que celles effectuées pour le peptide Aβ. L'immunisation active et passive a été étudiée chez des modèles de souris et les résultats sont encourageants. Elle utilise ou cible des épitopes de tau portant des sites de phosphorylation impliqués dans les tauopathies, ce qui permet de cibler spécifiquement les formes pathologiques de tau. Les traitements permettent de réduire les agrégats de tau et/ou d'améliorer les fonctions cognitives. Peu d'effets secondaires ont été observés. Des études supplémentaires sont nécessaires pour répondre à certaines questions portant, par exemple, sur le mécanisme de l'immunisation, la spécificité des épitopes des anticorps permettant la clairance de tau ou encore sur le choix des adjuvants à utiliser.

E. Autres stratégies thérapeutiques

D'autres cibles impliquées dans la maladie d'Alzheimer peuvent être visées. Par exemple, des chélateurs de métaux impliqués dans cette pathologie (pour l'agrégation de l'Aβ et la phosphorylation de tau) ont été testés^{121,124}. Le clioquinol permet de capturer le zinc ou le cuivre associés aux dépôts amyloïdes. Ce composé permet d'améliorer les fonctions cognitives d'après l'étude clinique en phase II. Un autre exemple est le ciblage de la dysfonction des mitochondries qui a lieu au stade précoce de la maladie d'Alzheimer. L'APP et l'Aβ seraient importés dans la mitochondrie et pourraient se lier à ses composants en entraînant une altération de la production de l'ATP et une augmentation du stress oxydant. Des composés empêchant l'entrée de l'Aβ dans la mitochondrie permettraient de contrer ce dérèglement. La maladie d'Alzheimer étant une maladie multifactorielle, un traitement ciblant un seul acteur de la maladie ne serait pas efficace. De plus, les personnes atteintes d'Alzheimer sont âgées et l'utilisation d'un cocktail de médicaments serait risquée. L'alternative serait des composés multi-cibles permettant de cibler plusieurs acteurs de la pathologie.

Le schéma présenté en Fig. 23, bien que tiré d'une publication de 2010, résume les stratégies et les composés engagés dans les études cliniques.



- ↓ production de l'Aβ ● ↓ agrégation de l'Aβ ● ↑ clairance de l'Aβ (immunothérapie)
- ↓ phosphorylation et agrégation de tau ● Drogues cholinergiques ● Autres

Fig. 23. Schéma des essais cliniques en cours en 2010 (*= essais stoppés)¹²⁴

I.2. Projet de recherche

Notre projet de recherche se divise selon deux grands axes. D'une part, nous avons développé des composés ciblant la fibrillogénèse du peptide Aβ₄₀ et de la protéine tau qui jouent un rôle majeur dans la maladie d'Alzheimer. D'autre part, afin d'étudier le mécanisme de sa fibrillation, nous avons conçu des mimes de la protéine tau. Pour ces deux études, nous avons utilisé un outil commun : un châssis moléculaire 2,5-dicétopiperazine (DCP). Le cycle DCP choisi est un cycle à six chaînons qui correspond à la condensation de deux acides aminés (Fig. 24 A).

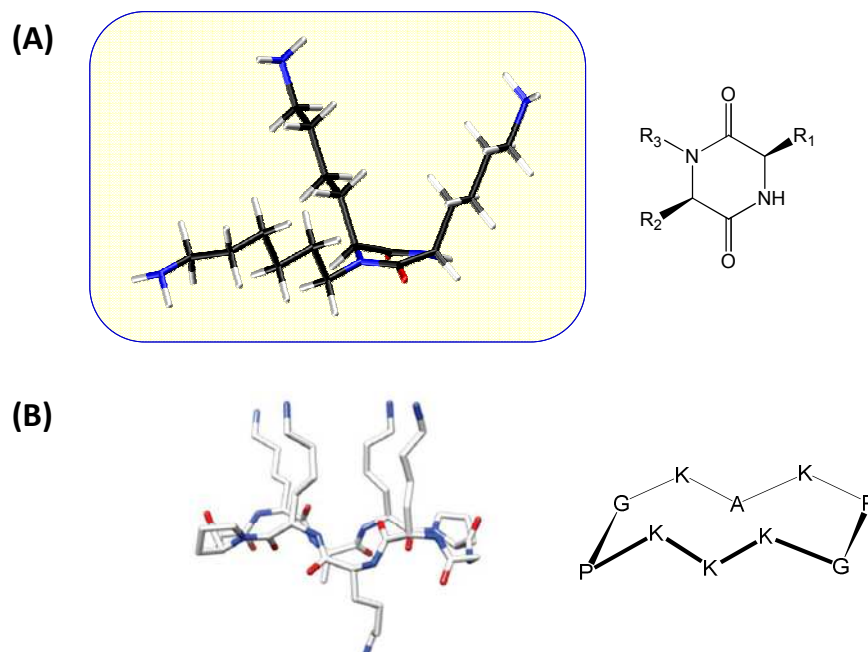


Fig. 24. Châssis moléculaires : (A) Dicétopiperazine (B) Cyclodécapeptide

Notre stratégie s'appuie sur des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire qui consistaient d'une part à concevoir des molécules modèles du peptide A β ₄₀ pour étudier le mécanisme de fibrillogénèse^{128,129,130}, et d'autre part à synthétiser des molécules inhibitrices de cette fibrillogénèse^{130,131,132,133}. La conception des assemblages moléculaires mimes ou inhibiteurs s'appuyait sur un cyclodécapeptide comme châssis moléculaire (Fig. 24 B).

Le décapeptide cyclique ou gabarit RAFT (Regioselectivity Addressable Functionalized Template) a été développé par l'équipe de Mutter à la fin des années

128.(a) Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of Amyloid β -Peptide Protofibril Formation by a Designed Template Assembly. *Angew. Chem.* **2006**, *118* (17), 2765-2768; (b) Ouberaï, M.; Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Amyloidogenesis highlighted by designed peptides forming supramolecular self-assemblies. *Chem Sci* **2011**, *2* (7), 1293-1300.

129.Dolphin, G. T.; Ouberaï, M.; Dumy, P.; Garcia, J., Designed Amyloid β Peptide Fibril—A Tool for High-Throughput Screening of Fibril Inhibitors. *ChemMedChem* **2007**, *2* (11), 1613-1623.

130.Ouberaï, M. Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse. Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2008.

131.Dolphin, G. T.; Chierici, S.; Ouberaï, M.; Dumy, P.; Garcia, J., A Multimeric Quinacrine Conjugate as a Potential Inhibitor of Alzheimer's β -Amyloid Fibril Formation. *ChemBioChem* **2008**, *9* (6), 952-963.

132.Ouberaï, M.; Dumy, P.; Chierici, S.; Garcia, J., Synthesis and Biological Evaluation of Clicked Curcumin and Clicked KLVFFA Conjugates as Inhibitors of β -Amyloid Fibril Formation. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (11), 2123-2132.

133.Ouberaï, M.; Brannstrom, K.; Vestling, M.; Olofsson, A.; Dumy, P.; Chierici, S.; Garcia, J., Clicked tacrine conjugates as acetylcholinesterase and β -amyloid directed compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (4), 1140-1147.

1980¹³⁴. Des études réalisées par RMN, modélisation moléculaire et rayons X, ont permis d'identifier la structure de ce châssis^{135,136}. Ce châssis cyclodécapeptide est une plateforme rigide qui comporte deux faces distinctes avec six sites d'ancrage pour des molécules. Ce châssis moléculaire a été utilisé dans de nombreux travaux, notamment au sein de notre laboratoire^{137,138}, par exemple pour concevoir des mimes structuraux tels que des mimes contraints de G-quadruplexes¹³⁹ et de structures tétramériques d'ADN¹⁴⁰, des composés multivalents à activité antibactérienne¹⁴¹, des vaccins synthétiques¹⁴², des vecteurs ciblant l'angiogénèse tumorale¹⁴³.

Cependant, du fait de son haut poids moléculaire et de sa rigidité, le cyclodécapeptide ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'originalité de notre approche repose sur l'utilisation d'un autre châssis peptidique, la dicétopiperazine (Fig. 24). En effet, le potentiel de la DCP en tant que molécule « navette » pour traverser la BHE a été montré *in vitro*¹⁴⁴. Des molécules ne passant pas la BHE peuvent la traverser lorsqu'elles sont greffées à la DCP. Ceci est primordial pour la conception d'inhibiteurs ou

134.(a) Mutter, M.; Altmann, K. H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S., Strategies for the de novo design of proteins. *Tetrahedron* **1988**, 44 (3), 771-785; (b) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical method for new proteins. Template-associated synthetic proteins (TASP). *Angew. Chem., Int. Ed* **1989**, 28, 1535-1554; (c) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35 (13-14), 1482-1485.

135.(a) Dumy, P.; Eggleston, I.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. In *Conformational Studies of RAFT Molecules for Protein Design*, Peptides-American-Symposium-, Escom Science Publishers: **1996**; pp 605-608; (b) Peluso, S.; Rückle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M., Crystal Structure of a Synthetic Cyclodécapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. *ChemBioChem* **2001**, 2 (6), 432-437.

136.Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M., A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (8), 1255-1258.

137.Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P., RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *J. Pept. Sci.* **2008**, 14 (2), 224-240.

138.(a) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (14), 2576-2579; (b) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D., Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem.* **2011**, 123 (8), 1941-1944.

139.Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbé, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, 9 (16), 2588-2591.

140.Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Defrancq, E., Click-click chemistry on a peptidic scaffold for easy access to tetrameric DNA structures. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (48), 5992-5994.

141.Bossu, I.; Sulc, M.; Krensek, K.; Dufour, E.; Garcia, J.; Berthet, N.; Dumy, P.; Kren, V.; Renaudet, O., Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (6), 1948-1959.

142.Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P., Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16 (5), 1149-1159.

143.Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P., Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (18), 5730-5739.

144.Teixidó, M.; Zurita, E.; Malakoutikhah, M.; Tarragó, T.; Giral, E., Diketopiperazines as a Tool for the Study of Transport across the Blood-Brain Barrier (BBB) and Their Potential Use as BBB-Shuttles. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (38), 11802-11813.

de marqueurs des DNF tant dans un but thérapeutique que diagnostic et est le premier point du cahier des charges que nous avons établi pour concevoir nos molécules ciblant la protéine tau et le peptide A β (Tabl. 4-).

Tabl. 4- Cahier des charges pour la conception d'assemblages ciblant la fibrillogénèse du peptide A β ₄₀ et de la protéine tau

Cahier des charges	Outils
Passage de la barrière hémato-encéphalique	Transporteur : le châssis dicétopiperazine
Cibler l'Aβ₄₀ et la protéine tau	Peptides ou molécules hétérocycliques décrites dans la littérature
Augmenter l'affinité par présentation multimérique	Châssis moléculaire : la dicétopiperazine
Spécificité Aβ / tau	Peptides
Introduction d'un marqueur (fluorophore, élément de radiomarquage...)	Couplage d'une histidine sur la dicétopiperazine
Concevoir un mime peptidique de la protéine tau	Sélection de séquences impliquées dans la fibrillation Présentation de ces séquences sur le châssis dicétopiperazine

Le squelette DCP, de part sa structure, impose une mobilité réduite de la conformation et impose donc une orientation dans l'espace précise des chaînes latérales des acides aminés. Cette pré-organisation du système doit permettre d'obtenir de véritables « pinces moléculaires ». Ce cycle peut être fonctionnalisé sur quatre positions : sur une face du cycle au niveau des chaînes latérales des acides aminés ou dans le plan du cycle au niveau des azotes du cycle (Fig. 24). Ce châssis permet donc de présenter plusieurs copies de molécules et de concevoir des assemblages multimériques de molécules ciblant la fibrillogénèse de la protéine tau et/ou du peptide l'A β . Un élément de détection peut également être couplé sur la DCP dans le plan du cycle tandis que les modules de reconnaissance seront orientés sur la face supérieure du cycle.

Les modules de reconnaissance seront soit des molécules hétéroaromatiques soit des séquences peptidiques. En général, les molécules hétéroaromatiques ne sont pas spécifiques car elles présentent des structures et des modes d'interaction communs pour les cibles biologiques. En revanche, les séquences peptidiques sont spécifiques car elles correspondent à des hexapeptides dont la séquence est homologue avec celle de la protéine ou peptide visé. De plus, ces séquences sont clairement impliquées dans la formation du feuillet β permettant la formation des fibres.

Ainsi, le cycle DCP compte tenu de ces différentes propriétés nous a semblé être un châssis moléculaire attractif pour la présentation multimérique de ligands des DNF ou des fibres d'A β en offrant la possibilité de passer de la BHE.

I.3. Le châssis moléculaire dicétopiperazine (DCP)

Le cycle 2,5-piperazinediione ou dicétopiperazine (DCP) est un cycle à six atomes qui correspond à la condensation de deux acides aminés. Une des DCP utilisée en tant que châssis moléculaire pour notre étude est représentée ci-dessous (Fig. 25).

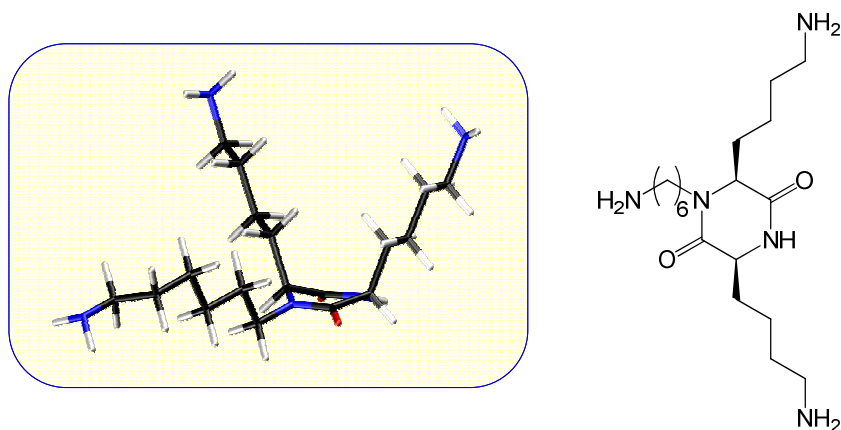


Fig. 25. Structure d'une des DCP utilisée pour notre étude

Cette DCP correspond à la condensation de deux lysines dont les chaînes latérales sont orientées sur une même face du cycle grâce à la stéréochimie imposée. Une chaîne alkyle a également été introduite sur un des azotes du cycle et pointe dans le plan du cycle. Ainsi ce cycle permet une pré-organisation dans l'espace de ses substituants. D'une façon plus générale la dicétopiperazine est un cycle semi-rigide, qui peut être hautement fonctionnalisé (six positions), dont la stéréochimie de ses substituants peut être contrôlée, résistant à la protéolyse et dont les groupes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes au niveau du lien amide augmentent les interactions avec les cibles biologiques^{145,146}. Ainsi ce squelette peptidique est attractif pour la conception de molécules bioactives. Dans un premier temps, nous décrirons brièvement l'intérêt du cycle DCP en chimie médicinale. En effet, ce cycle se retrouve dans beaucoup de molécules extraites de produits naturels et qui possèdent des activités biologiques variées. Dans une seconde partie nous présenterons l'utilisation du cycle DCP en tant que châssis moléculaire pour la synthèse de mimes de β -turn et de récepteurs.

145. Borthwick, A. D., 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (7), 3641-3716.

146. Ressurreição, A. S. M.; Delatouche, R.; Gennari, C.; Piarulli, U., Bifunctional 2,5-Diketopiperazines as Rigid Three-Dimensional Scaffolds in Receptors and Peptidomimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011 (2), 217-228.

I.3.1. Le cycle DCP dans les molécules bioactives

Le cycle 2,5-dicétopiperazine est largement retrouvé dans les produits naturels mais se forme également lors de la dégradation des peptides ou lors de la synthèse peptidique (réaction parasite)^{145,147}. Beaucoup de molécules extraites de composés naturels et basées sur le cycle dicétopiperazine présentent diverses activités biologiques allant de l'antibiotique aux vaccins synthétiques et agents anticancéreux. Quelques exemples de ces composés sont présentés dans la Fig. 26.

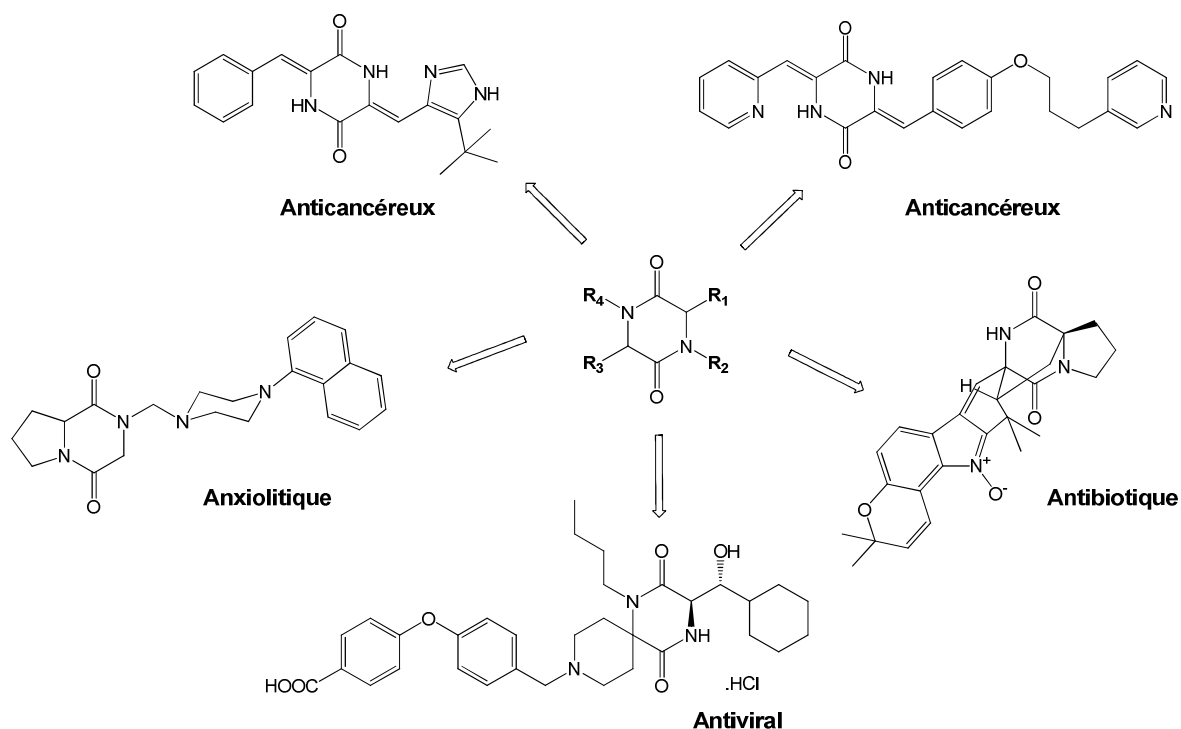


Fig. 26. Exemples de molécules bioactives possédant un cycle DCP

Les séries de molécules **A** et **B** (Fig. 27) possèdent des activités neuroprotectrices^{145,148}. La dicétopiperazine cyclo-(His-Pro) **A1** est un peptide produit suite à la coupure enzymatique du tripeptide hypothalamique TRH (thyrotrophin-releasing hormon). Cette molécule empêche la mort neuronale induite par des radicaux libres, la mobilisation de calcium et une blessure traumatique. Différents dérivés ont été conçus à partir de ce composé, en faisant varier les motifs histidine et/ou proline. Par exemple, la molécule **A2** possède la meilleure activité neuroprotectrice *in vitro* contre par exemple le glutamate, le sulfate de fer, le peptide β amyloïde, une blessure traumatique ou la privation d'oxygène et de glucose. *In vivo*, après injection par intraveineuse, **A2** diminue les lésions cérébrales et améliore l'activité neurologique suite à des blessures

147. Martins, M. B.; Carvalho, I., Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron* **2007**, 63 (40), 9923-9932.

148. Cornacchia, C.; Cacciatore, I.; Baldassarre, L.; Mollica, A.; Feliciani, F.; Pinnen, F., 2,5-Diketopiperazines as neuroprotective agents. *Mini Rev Med Chem* **2012**, 12 (1), 2.

traumatiques au cerveau chez le rat et la souris. Cette molécule possède un caractère lipophile suffisant pour passer la BHE et est actuellement utilisée pour des essais cliniques.

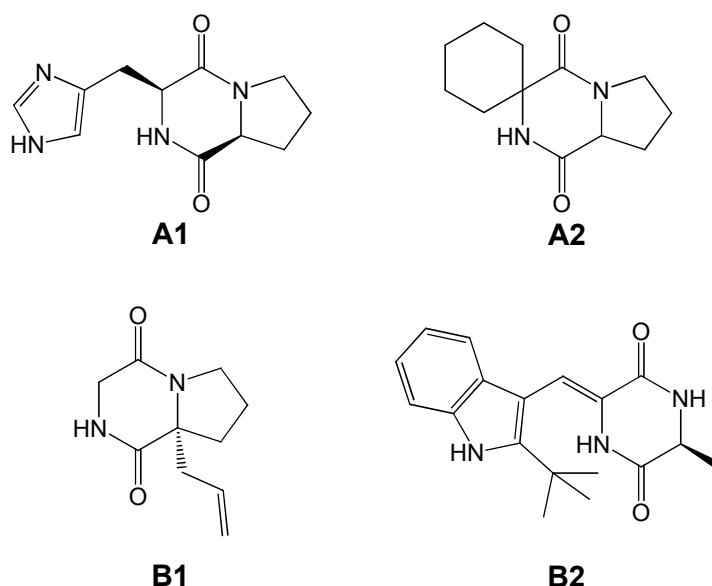


Fig. 27. Exemples de molécules neuroprotectrices possédant un cycle DCP

La série **B** est composée de dicetopiperazines comportant des doubles liaisons dans leurs chaînes latérales. La molécule **B1** (NNZ 2591) est synthétisée en introduisant un substituant allylique sur le squelette dicetopiperazine. Cette modification permet d'augmenter le caractère lipophile du composé dans le but de faciliter son passage par la BHE et de le rendre résistant à la dégradation protéolytique. Le composé alkylé **B1** possède une bonne activité neuroprotectrice, passe la BHE non lésée et reste détectable plusieurs heures après l'injection. Il a été montré récemment que cette molécule pourrait diminuer la progression de la maladie de Parkinson et la traiter. Plusieurs dérivés, par exemple **B2**, ont été synthétisés par modification structurale d'une dicetopiperazine isolée d'un champignon marin *Aspergillus sp.* Leurs capacités à inhiber la formation de nitrotyrosine par un producteur de peroxynitrite ont été évaluées. Le peroxynitrite est un oxydant impliqué dans le dommage oxydatif observé pour les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les composés synthétisés possèdent un fort pouvoir inhibiteur donc un fort pouvoir antioxydant et ont une activité cytoprotectrice *in vitro*.

I.3.2. La DCP en tant que châssis moléculaire

Le cycle DCP a également été largement utilisé en tant que châssis moléculaire pour la synthèse de peptidomimétiques et de mimes de récepteurs^{145,146}. En effet la structure semi-rigide de ce cycle ainsi que la stéréochimie contrôlée de ses substituants

permettent une orientation prédéfinie des substituants dans l'espace. Ce cycle peut donc mimer des conformations peptidiques telles que des β -turn.

1.3.2.1. Mimes de β -turn

Le β -turn présenté en Fig. 28 est une structure secondaire largement retrouvée dans de nombreux peptides et protéines biologiquement actifs¹⁴⁶. Il correspond à une séquence de quatre acides aminés dont dix atomes sont impliqués dans un réseau cyclique *via* une liaison hydrogène intramoléculaire et dans lequel la distance entre les $\text{Ca}(i)$ et $\text{Ca}(i+3)$ varie entre 4 et 7 Å. La Fig. 28 représente également les trois grandes classes de mimes de β -turn : (a) les mimes de β -turn interne, (b) les mimes de β -hairpin, (c) les mimes comportant un β -turn externe¹⁴⁶.

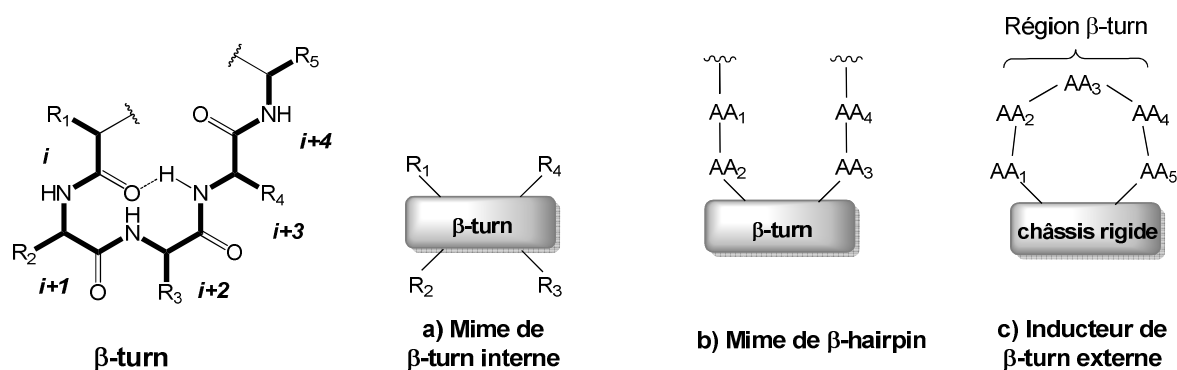


Fig. 28. Grandes classes de mimes de β -turn¹⁴⁶

La première classe, les mimes de β -turn interne, regroupe les châssis présentant des chaînes latérales dont la trajectoire mime un tour dans la chaîne peptidique provoquant l'inversion de l'orientation des chaînes latérales. De nombreux exemples sont décrits dans la littérature¹⁴⁶ et la Fig. 29 en présente deux. Golebiowski et *al* ont développé une méthode de synthèse de DCP bicycliques à haut-débit sur support solide^{146, 149}. Les auteurs ont ainsi synthétisé une librairie de mimes de β -turn internes de structure générale **A** (Fig. 29). Des études de modélisation moléculaire ont montré que les deux épimères de la DCP **B** présentent une structure β -turn de type I. Un autre exemple est illustré par la DCP **C** développée par Kim et *al*¹⁵⁰.

149.(a) Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Shao, X.; Chen, J. J.; Colson, A.-O.; Grieb, A. L.; Russell, A. F., Solid-Supported Synthesis of a Peptide β -Turn Mimetic. *Org. Lett.* **2000**, 2 (17), 2615-2617; (b) Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Chen, J. J.; Shao, X., Solid supported high-throughput organic synthesis of peptide β -turn mimetics via tandem Petasis reaction/diketopiperazine formation. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (25), 4841-4844; (c) Golebiowski, A.; Jozwik, J.; Klopfenstein, S. R.; Colson, A.-O.; Grieb, A. L.; Russell, A. F.; Rastogi, V. L.; Diven, C. F.; Portlock, D. E.; Chen, J. J., Solid-supported synthesis of putative peptide β -turn mimetics via Ugi reaction for diketopiperazine formation. *J. Comb. Chem.* **2002**, 4 (6), 584-590.

150.Kim, H.-O.; Nakanishi, H.; Lee, M. S.; Kahn, M., Design and synthesis of novel conformationally restricted peptide secondary structure mimetics. *Org. Lett.* **2000**, 2 (3), 301-302.

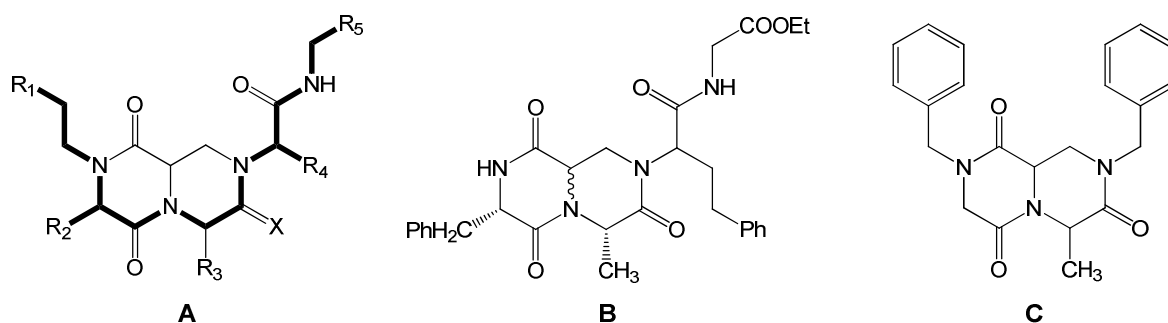


Fig. 29. Mimes de β -turn internes basés sur la DCP^{149,150}

Ressurreição et al ont synthétisé des mimes de feuillets β en utilisant la DCP **A** (Fig. 30) comme inducteur de β -hairpin^{146,151}. Les composés **B** et **C** présentent une structure en feuillet β d'après des études de conformation par RMN¹H (NOE), spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire. En particulier le tétramère **D** présente une signature en feuillet β très marquée en dichroïsme circulaire¹⁵².

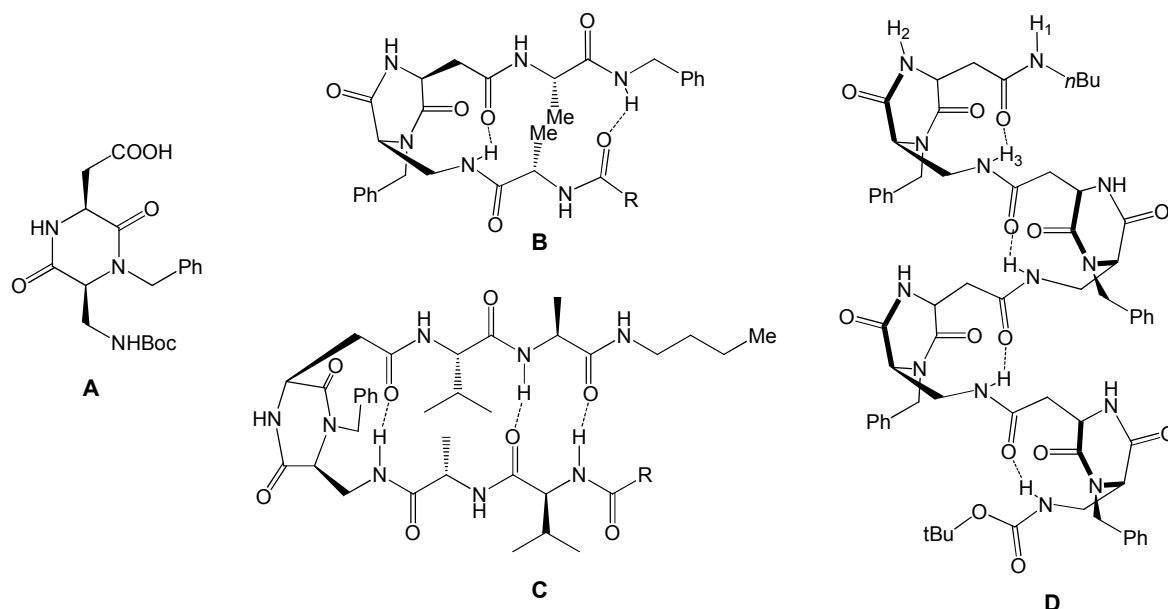


Fig. 30. Mimes de β -hairpin basés sur la DCP¹⁴⁶

La troisième classe de mimes peptidiques utilisant la DCP comme β -turn externe est illustrée par les peptidomimétiques des séquences NPNA (Fig. 31) et RGD (Fig. 32)^{145,146}. Le tetrapeptide NPNA est une unité de répétition de la protéine de surface circumsporozite (CS) du parasite de la malaria *Plasmodium falciparum*, qui a tendance à

151. Ressurreição, A. S. M.; Bordessa, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Gennari, C.; Piarulli, U., Synthesis and conformational studies of peptidomimetics containing a new bifunctional diketopiperazine scaffold acting as a β -hairpin inducer. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (2), 652-660.

152. Delatouche, R.; Durini, M.; Civera, M.; Belvisi, L.; Piarulli, U., Foldamers of bifunctional diketopiperazines displaying a β -bend ribbon structure. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (32), 4278-4280.

adopter une structure en feuillet β . Robinson et col.¹⁵³ ont synthétisé une série de peptides cycliques **B**₁ à **B**₄ basée sur les châssis DCP **A**₁ à **A**₄ (Fig. 31) comportant un ou deux résidus proline. Les séquences peptidiques ANPNAA ont ensuite été couplées sur ces châssis pour donner les peptides cycliques correspondant **B**₁ à **B**₄. Les peptides **B**₁, **B**₂ et **B**₄ adoptent une structure incluant un β -turn dans le motif NPNA d'après les études de RMN¹H (NOE). Le mime **B**₃ quant à lui montre plutôt une conformation étendue car le châssis DCP **A**₃ utilisé présente une géométrie bien différente de celle des trois autres DCP. Enfin, le composé **B**₁ d'après des études immunologiques induit des anticorps anti-sporozite chez la souris.

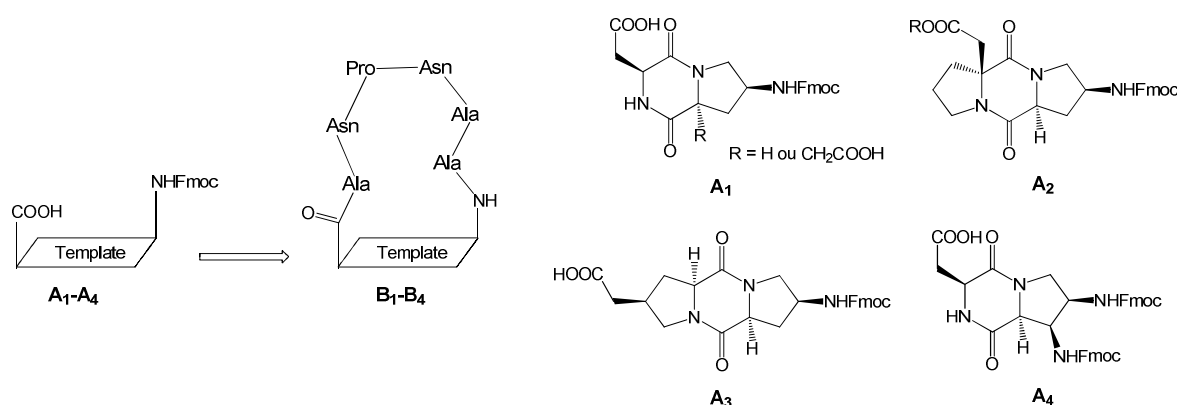


Fig. 31. B-turn externe induit par la DCP : exemple du peptide NPNA¹⁴⁶

Le châssis **A**₁ (Fig. 31) a également été utilisé pour synthétiser le peptide cyclique **C** contenant le motif RGD (Fig. 32)^{146,154}. Ce tripeptide est un motif présent dans plusieurs ligands qui reconnaissent et lient les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ impliquées dans l'angiogénèse, la progression tumorale et la formation de métastases. Aucune structure n'a pu précisément être identifiée en RMN¹H car le composé **C** présente une interconversion entre deux conformations ou plus¹⁵⁴. Les études biologiques montrent que ce composé possède une affinité modeste ($IC_{50}=0,1 \mu M$) pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

153.(a) Beeli, R.; Steger, M.; Linden, A.; Robinson, J. A., A Tricyclic Template Derived from (2S, 4R)-4-Hydroxyproline for the Synthesis of Protein Loop Mimetics. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79 (8), 2235-2248; (b) Pfeifer, M. E.; Linden, A.; Robinson, J. A., Synthesis of a Novel Tricyclic Dipeptide Template and Its Incorporation into a Cyclic Peptide Mimetic Containing an NPNA Motif. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80 (5), 1513-1527; (c) Pfeifer, M. E.; Robinson, J. A., Stabilisation of β -hairpin conformations in a protein surface mimetic using a bicyclic template derived from (2S, 3R, 4R)-diaminoproline. *Chem. Commun.* **1998**, (18), 1977-1978; (d) Pfeifer, M. E.; Moehle, K.; Linden, A.; Robinson, J. A., Synthesis and Solution Conformation of β -Hairpin Mimetics Utilizing a Template Derived from (2S, 3R, 4R)-Diaminoproline. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83 (2), 444-464.

154. Emery, F.; Bisang, C.; Favre, M.; Jiang, L.; Robinson, J. A., A template for the solid-phase synthesis of conformationally restricted protein loop mimetics. *Chem. Commun.* **1996**, (18), 2155-2156.

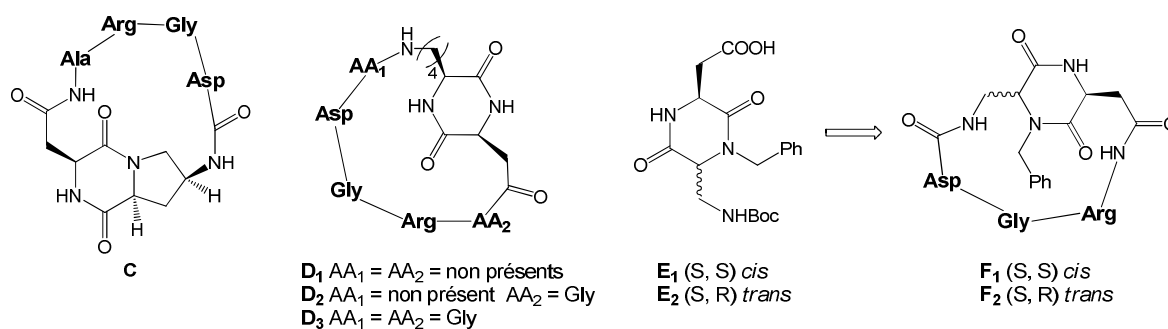


Fig. 32. β -hairpin induit par la DCP : exemple du peptide RGD¹⁴⁶

Royo et al¹⁵⁵ dans une approche similaire ont synthétisé les DCP **D₁** à **D₃** contenant respectivement les séquences RGD, RGDG et GRGDG (Fig. 32). Le peptide cyclique **D₁** contenant la séquence RGD la plus contrainte présente la meilleure affinité pour le récepteur $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50}=4\ \mu M$). Lorsque la longueur de la boucle est augmentée une perte de l'activité est observée. Enfin, Ressureição et al¹⁵⁶ ont couplé le motif RGD sur les DCP **E₁** et **E₂**. Ces deux châssis sont des diastéréoisomères et possèdent donc une géométrie différente : l'une a une configuration *cis* (**E₁**) et l'autre une configuration *trans* (**E₂**). Le peptide cyclique **F₂** obtenu à partir de la DCP **E₂** a une forte affinité ($IC_{50}=3,2\ nM$) pour le récepteur $\alpha_v\beta_3$ alors que son isomère *cis* **F₁** est 1 000 fois moins affin ($IC_{50}=3,9\ \mu M$). Ceci peut être attribué à la forte pré-organisation structurale de la DCP qui engendre un pseudo β -turn et induit une conformation étendue du motif RGD dans le composé **F₂**. La DCP **F₂** est 40 fois plus sélective envers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ que l'intégrine $\alpha_v\beta_5$.

1.3.2.2. Récepteurs à deux bras

Le squelette DCP a également été utilisé comme châssis moléculaire pour préparer des mimes de récepteurs (Fig. 33)¹⁴⁶. Ces composés sont synthétisés le plus souvent par chimie combinatoire. Ces récepteurs, présentant deux bras peptidiques, sont des hôtes pour des molécules invitées (anions, cations, petits molécules, petits peptides...). Le choix du châssis moléculaire impose la taille de la cavité pour recevoir la molécule invitée et permet aussi de présenter les chaînes peptides dans une géométrie adaptée pour sa complexation. Wennemers et col. ont développé une série de récepteurs dont la

155.Royo, M.; Van Den Nest, W.; del Fresno, M.; Frieden, A.; Yahalom, D.; Rosenblatt, M.; Chorev, M.; Albericio, F., Solid-phase syntheses of constrained RGD scaffolds and their binding to the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (42), 7387-7391.

156.da Ressureição, A. S. M.; Vidu, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Potenza, D.; Manzoni, L.; Onger, S.; Gennari, C.; Piarulli, U., Cyclic RGD-Peptidomimetics Containing Bifunctional Diketopiperazine Scaffolds as New Potent Integrin Ligands. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15 (45), 12184-12188.

structure générale est représentée par la DCP **A** (Fig. 33)¹⁵⁷. Ces composés sont conçus à partir d'un châssis DCP tricyclique synthétisé à partir de la (2S, 4S)-4-hydroxyproline. Ce châssis rigide permet d'espacer et de présenter dans une conformation *cis* les chaînes peptidiques pour une liaison optimale à leur cible. Cinq récepteurs ont été obtenus, comportant chacun la L- ou D-tyrosine marquée par un colorant et les acides aminés phénylalanine, asparagine, glutamine aux deux positions restantes. Ces récepteurs ont été ensuite utilisés pour cribler une librairie de tripeptides synthétisés par chimie combinatoire à partir de 29 L- et D-acides aminés (soit 24 389 peptides différents)¹⁵⁸. Ces récepteurs se lient très sélectivement à des peptides dans les solvants organiques. Les cinq récepteurs testés se lient à des tripeptides différents.

Carolan et al¹⁵⁹ ont synthétisé un autre type de récepteur basé sur le châssis DCP portant deux bras dipicolylamine symétriques dans une configuration *cis*. L'addition de Zn(OAc)₂ permet de former le complexe **B** (Fig. 33). Ce complexe a été étudié en tant que sonde pour discriminer des anions présents en conditions physiologiques. Le complexe **B** se lie sélectivement aux oxoanions di et triphosphate par rapport aux autres ions testés (sels de sodium, sulfate, bromure, iodure, acétate, citrate...).

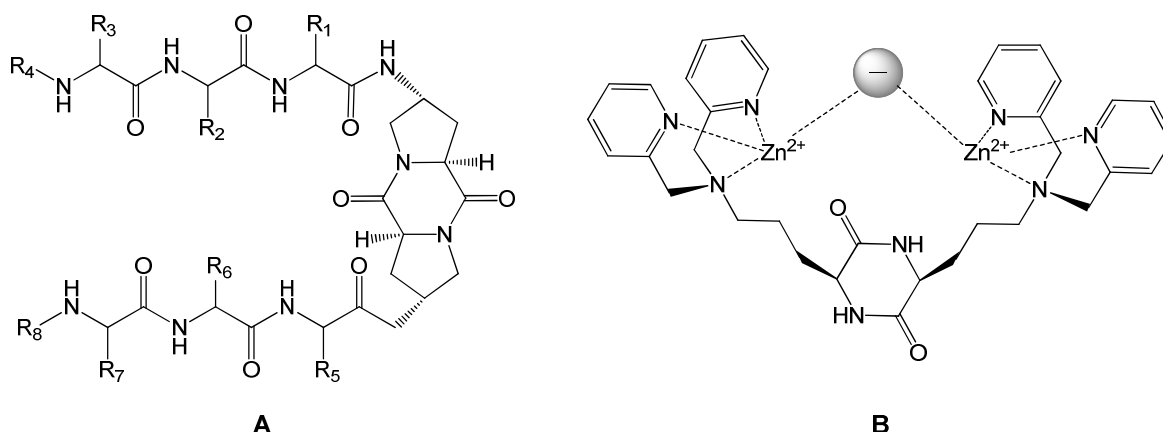


Fig. 33. Châssis DCP pour la synthèse de récepteurs à deux bras

I.3.3. Utilisation de la DCP en tant que navette pour passer la BHE

Teixidó et al¹⁴⁴ ont étudié le potentiel de châssis DCP pour passer la BHE *in vitro* ainsi que la possibilité de s'en servir de « navette » pour des molécules ne passant pas la

157.(a) Wennemers, H.; Conza, M.; Nold, M.; Krattiger, P., Diketopiperazine receptors: a novel class of highly selective receptors for binding small peptides. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7 (15), 3342-3347; (b) Conza, M.; Wennemers, H., Selective binding of two-armed diketopiperazine receptors to side-chain-protected peptides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (8), 2696-2698.

158. Wennemers, H.; Nold, M. C.; Conza, M. M.; Kulicke, K. J.; Neuburger, M., Flexible but with a Defined Turn—Influence of the Template on the Binding Properties of Two-Armed Receptors. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9 (2), 442-448.

159. Carolan, J. V.; Butler, S. J.; Jolliffe, K. A., Selective anion binding in water with use of a zinc (II) dipicolylamino functionalized diketopiperazine scaffold. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (8), 2992-2996.

BHE seules. Les auteurs ont observé que la DCP **A** (DCP N-MePhe-N-MePhe, Fig. 34), provenant de la dégradation d'un trimère N-methylphenylalanine (Ac-N-MePhe-N-MePhe-N-MePhe-CONH₂), pouvait traverser un modèle de BHE de bovin *in vitro*. Les auteurs ont synthétisé une première librairie de quinze DCP sur support solide. Leur structure est basée sur la DCP **A** dont une chaîne latérale a été modifiée pour tester l'effet de plusieurs facteurs : l'ajout ou le retrait d'un groupe méthylène, l'addition d'un atome d'azote ou d'oxygène, l'addition de groupes aromatiques plus volumineux et l'ajout d'une chaîne hydrophobe aliphatique. Ces composés sont pour la plupart méthylés sur un azote de leur cycle. La perméabilité de ces composés est évaluée *in vitro* à travers une membrane artificielle provenant d'un extrait lipidique cérébral de bovin. Cette membrane permet d'évaluer le passage de la BHE des composés par diffusion passive car la bicouche lipidique de bovin utilisée ne possède pas de transporteurs actifs. Le transport par diffusion passive est spontané et non saturable. Le propanolol et la carbamazépine sont utilisés comme molécules contrôles car elles possèdent une bonne pénétration cérébrale.

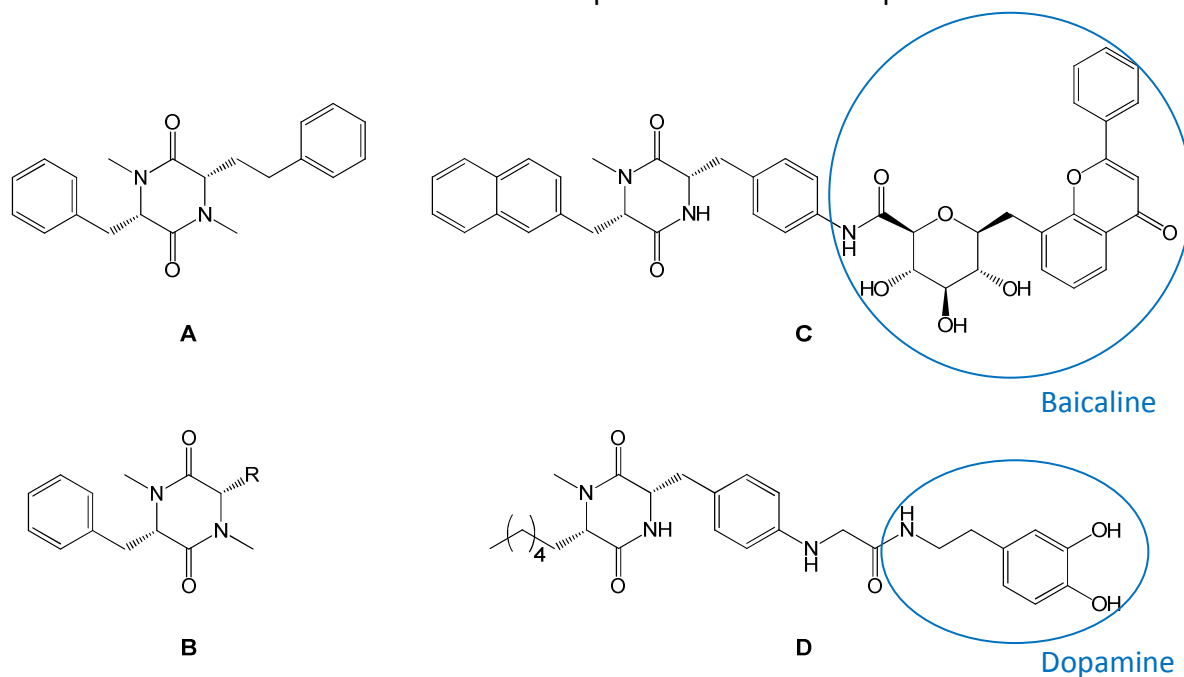


Fig. 34. Utilisation de la DCP en tant que transporteur pour passer la BHE

Le test de la première librairie montre les DCP comportant un groupe méthyle sur un atome d'azote du cycle ainsi qu'un groupe apolaire aromatique ou aliphatique sur la chaîne latérale possèdent une bonne capacité à traverser la membrane. La présence de deux groupes méthyles sur les azotes du cycle DCP augmente le passage des composés à travers la membrane. A partir de ces observations les auteurs ont synthétisé une seconde librairie de six DCP. La structure générale de ces composés correspond à la DCP **B** de la Fig. 34 qui possède deux méthyles sur les azotes de son cycle et dont le groupement R est un groupe apolaire aromatique ou saturé. La seconde méthylation est additionnée dans le but d'augmenter le temps de demi-vie des composés en les rendant plus résistants aux

peptidases mais aussi d'améliorer leur passage à travers la BHE en diminuant leur capacité à former des liaisons hydrogènes. Ceci permet d'améliorer la capacité de certains composés à traverser la membrane ($\approx 40\%$ de transport) par rapport aux composés ne possédant qu'un méthyle ($\approx 20\%$ de transport). Pour d'autres, la capacité de transport n'est pas modifiée car l'ajout du second méthyle augmente l'hydrophobicité des composés ce qui entraîne leur accumulation dans la membrane. Le même phénomène est observé par ajout d'un cycle aromatique plus volumineux. Ainsi, une réelle amélioration est observée uniquement lorsque le composé n'est pas trop apolaire. Par comparaison avec la carbamazépine (26% de transport) et le propranolol (27% de transport), les DCP sélectionnées par le test sont aptes à passer la BHE.

Les DCP identifiées avec les plus hauts pourcentages de transport à travers la membrane sont utilisées comme navette pour des molécules ne passant pas la BHE. Les deux molécules choisies par les auteurs sont la baicaline (inhibiteur non nucléosidique de la reverse transcriptase du VIH) et la dopamine (Fig. 34). Ces deux molécules ne traversent pas la membrane artificielle dans les conditions du test. Les DCP **C** et **D** possèdent les plus hauts pourcentages de transport à travers la membrane : 7,22% et 0,67% respectivement. Bien que ces valeurs ne soient pas très élevées, une capacité de transport à travers la BHE est amenée par le cycle DCP.

II. Chapitre 1 : Conception, synthèse et évaluation d'assemblages moléculaires ciblant les protéines à amyloses de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer met en jeu plusieurs facteurs qui peuvent être ciblés en thérapie. Comme il a été décrit dans la partie précédente, la formation des fibres amyloïdes β et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) de la protéine tau sont impliqués dans le processus de neurodégénération. L'inhibition de ces phénomènes pourrait contribuer à réduire la mort neuronale. Plusieurs inhibiteurs de la fibrillogénèse de l' $A\beta_{40}$ et de la protéine tau sont décrits dans la littérature. Ces composés peuvent être des peptides, des dérivés de peptides ou des molécules hétéroaromatiques.

Dans cette première partie, nous allons décrire des inhibiteurs ciblant la fibrillation du peptide $A\beta_{40}$ et de la protéine tau. La conception de ces composés repose sur une présentation multimérique de molécules inhibitrices de la fibrillogénèse sur un châssis moléculaire. En effet, des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont montré que cette approche permet d'obtenir des composés avec un meilleur pouvoir inhibiteur que les molécules seules¹³⁰. Dans cette étude des composés inhibiteurs connus dans la littérature ont été liés sur un châssis cyclodécapeptidique. Le même type d'approche a été réalisé au cours de nos travaux mais un nouveau type de châssis moléculaire a été utilisé : la dicétopiperazine (DCP). Afin d'évaluer nos assemblages *in vivo* chez la souris et concevoir des radiotraceurs ciblant spécifiquement le peptide $A\beta$ ou la protéine tau, une histidine a également été introduite sur le châssis DCP. Cet acide aminé permet la formation d'un complexe avec l'isotope radioactif ^{99m}Tc . La mise au point de radiotraceurs pourrait constituer de nouveaux outils pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

II.1. Etat de l'art sur les inhibiteurs de la fibrillogénèse de l' $A\beta_{40}$ et de tau

II.1.1. Inhibiteurs peptidiques

II.1.1.1. Inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide $A\beta_{40}$

De nombreux inhibiteurs ont été développés ces dernières années dont la plupart sont de nature peptidique ou sont des mimes de peptides. Ces composés découlent soit d'une sélection par méthode combinatoire, soit d'une approche dite rationnelle basée sur la structure du peptide $A\beta$ et de ses fibres. Cette dernière approche a été la plus exploitée, c'est pourquoi une grande partie des inhibiteurs est basée sur le cœur

hydrophobe du feuillet β du domaine N-terminal : la séquence LVFF(A β_{17-20}). Le processus de fibrillation de l'A β étant un processus d'auto-assemblage, la plupart des inhibiteurs peptidiques sont construits par homologie de séquence en se basant sur le peptide LVFF (A β_{17-20}). Ces composés résultent de l'ajout de résidus aux extrémités N et/ou C-terminales à cette séquence ou de modifications de la séquence elle-même (modifications des chaînes latérales des acides aminés, modifications du squelette peptidique...). Tous ces composés bloquent l'agrégation en empêchant la propagation de la formation de feuillets β et sont appelés des briseurs de feuillets β (« β -sheet breakers »).

Les premiers travaux effectués sont ceux de l'équipe de Tjernberg²⁹. Les auteurs ont recherché les séquences peptidiques homologues au peptide A β et possédant une bonne affinité de liaison avec celui-ci. Les peptides KLVFF (A β_{16-20}) et QKLVFF (A β_{15-20}) possèdent la meilleure affinité pour l'A β . Une étude de mutation successive des acides aminés par l'alanine montre que les acides aminés essentiels pour maintenir une bonne affinité et une activité inhibitrice sont la lysine, la leucine et la seconde phénylalanine (motif KLXXF). Le peptide Ac-QKLVFF permet d'empêcher la formation de fibres quand il est incubé en quantité équimolaire avec le peptide A β_{40} .

Simultanément, Soto et al¹⁶⁰ ont conçu des inhibiteurs basés sur le motif LVFFA. Leur concept est d'inhiber la fibrillation par des peptides homologues à l'A β possédant un degré d'hydrophobicité similaire à la séquence LVFFA mais avec une faible tendance à former des feuillets β . La proline est un acide aminé peu présent dans les feuillets β ; l'azote secondaire impliqué dans la liaison peptidique n'étant pas disponible pour le réseau de liaisons hydrogènes impliqué dans le feuillet β et l'angle de torsion imposé par la liaison peptidique n'étant pas compatible avec la géométrie d'un feuillet β . Ainsi les auteurs ont décidé d'introduire des prolines dans la séquence A β_{15-25} (QKLVFFAEDVG) ainsi que des acides aminés polaires pour augmenter la solubilité. De cette façon, les auteurs ont conçus l'inhibiteur iA β 1 (RDLFFDVPID). Ce composé possède une bonne affinité pour l'A β , inhibe la formation de fibres et permet de les désassembler. Afin d'améliorer la résistance aux protéases de leur composé, les auteurs ont diminué le nombre de résidus. Le peptide iA β 5, LPFFD, a été retenu. En effet ce composé possède la même activité inhibitrice *in vitro* que le composé iA β 1 et ces résultats sont confirmés *in vivo* chez le rat (inhibition de la formation de dépôts amyloïdes)¹⁶¹. Néanmoins plusieurs limitations sont à prendre en compte lorsque des peptides sont utilisés en thérapie : le

160.Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B., Inhibition of Alzheimer's Amyloidosis by Peptides That Prevent β -Sheet Conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 226 (3), 672-680.

161.Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Asok Kumar, R.; Castano, E. M.; Frangione, B., β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* **1998**, 4 (7), 822-826.

passage de la BHE, la réponse immunitaire et la sensibilité à la dégradation protéolytique. Les deux premières peuvent être contournées en diminuant le nombre d'acides aminés. Ceci est illustré par exemple avec le peptide iA β 5 synthétisé par l'équipe de Soto. La troisième limitation peut être résolue en introduisant des acides de configuration D. Les auteurs ont synthétisé le peptide iA β 1 dans sa configuration D qui possède une activité inhibitrice similaire envers le peptide A β et est plus résistant aux protéases. Afin d'augmenter la perméabilité du dérivé pour le passage de la BHE, Poduslo et al¹⁶² ont greffé une polyamine, la putrescine (PUT), à l'extrémité N-terminale du peptide iA β 1 iodé (¹²⁵I-PUT-YiA β 1). Le peptide YiA β 1 est basé sur la structure du peptide iA β 1 mais la phénylalanine 6 est remplacée par une tyrosine pour permettre un marquage à l'iode 125 et 131. Les auteurs ont montré que le couplage de polyamines naturelles à des protéines permet d'augmenter leur capacité à passer la BHE. Cependant le peptide ¹²⁵I-PUT-YiA β 1 est très sensible aux protéases et se dégrade rapidement dans le plasma des rats. L'énantiomère D de ce peptide est quant à lui résistant aux protéases, empêche la formation de fibres *in vitro* et sa perméabilité à la BHE est cinq à sept fois meilleure que celle du peptide ¹²⁵I-YiA β 1.

Chalifour et al¹⁶³ ont étudié la stéréosélectivité de l'interaction entre l'A β et des peptides inhibiteurs basés sur la séquence KLVFF. Pour cela les auteurs ont synthétisé les peptides klvffa, kklvfa, kivffa, kfvffa et kvvffa de configurations D. Tous ces composés sont *in vitro* des inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'A β ₄₀ plus actifs que leurs énantiomères. Afin de vérifier la réciprocité du phénomène, les auteurs ont synthétisé le D-A β ₄₀ et testé de nouveau les composés L et D sur la fibrillation : les inhibiteurs L possèdent une meilleure activité inhibitrice de la fibrillogénèse de la D-A β ₄₀ que leurs énantiomères. Enfin, le composé D-kklvffa réduit la toxicité cellulaire de l'A β ₄₀ et de l'A β ₄₂ à plus faible concentration que son énantiomère.

Une limitation importante de l'utilisation de la séquence KLVFF est sa faible solubilité en milieux aqueux. Pour contourner cela, Austen et al¹⁶⁴ ont utilisé une stratégie qu'ils avaient mise au point pour la conception d'inhibiteurs de la fibrillogénèse du Prion. Celle-ci consiste à additionner deux arginines aux extrémités N et C-terminales des séquences inhibitrices. Ainsi les deux inhibiteurs suivants ont été conçus :

162.Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Kumar, A.; Frangione, B.; Soto, C., β -sheet breaker peptide inhibitor of Alzheimer's amyloidogenesis with increased blood-brain barrier permeability and resistance to proteolytic degradation in plasma. *J. Neurobiol.* **1999**, 39 (3), 371-382.

163.Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boulé, M.; Sarazin, P.; Stéa, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F., Stereoselective Interactions of Peptide Inhibitors with the β -Amyloid Peptide. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (37), 34874-34881.

164.Austen, B. M.; Paleologou, K. E.; Ali, S. A. E.; Qureshi, M. M.; Allsop, D.; El-Agnaf, O. M. A., Designing Peptide Inhibitors for Oligomerization and Toxicity of Alzheimer's β -Amyloid Peptide†. *Biochemistry* **2008**, 47 (7), 1984-1992.

RGKLVFFGR (OR1) et RGKLVFFGR-NH₂ (OR2). L'extrémité C-terminale amide d'OR2 permet de diminuer la charge globale du peptide. Ces deux composés possèdent une bonne activité inhibitrice de la fibrillogénèse des peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ bien qu'OR2 soit légèrement plus efficace. Un test ELISA permet de montrer qu'OR2 se lie au niveau des oligomères (mais pas OR1). De plus, ce dernier diminue la toxicité des peptides Aβ dans des cultures de neurones alors qu'OR1 n'a pas d'activité protectrice. D'après ces résultats, la toxicité du peptide Aβ peut être attribuée aux oligomères. Cependant, le peptide OR2 étant instable dans le plasma et les extraits de cerveau humain, deux équipes ont synthétisé la séquence inverse en série D de ce peptide, Ac-rGffvlkGr-NH₂^{165,166}. Ce peptide est résistant aux protéases et stable dans le plasma ainsi que dans les extraits de cerveau humain¹⁶⁶. De plus son activité inhibitrice reste comparable à celle de OR2 (moins de 10% d'agrégation des peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ en condition stœchiométrique)^{165,166}. Il se lie également sur les oligomères et empêche la toxicité de l'Aβ₄₂ pour un ratio molaire 1:1 (Aβ/peptide)¹⁶⁶.

D'autres travaux impliquent la modification du squelette du peptide Aβ par introduction d'acides aminés N-méthylés. Les premiers travaux ont été réalisés par Hughes et al¹⁶⁷ en modifiant la séquence Aβ₂₅₋₃₅. Ce peptide correspond au plus court fragment qui forme des fibres en feuillets β provoquant une toxicité cellulaire similaire à celle de l'Aβ. Les inhibiteurs sont conçus comme précédemment sur l'homologie de séquence afin d'assurer une liaison au peptide Aβ tout en empêchant le processus de fibrillation en bloquant l'addition d'oligomères supplémentaires. Pour cela un groupe méthyle est introduit au niveau d'un lien amide afin d'empêcher la propagation du réseau de liaisons hydrogènes permettant l'assemblage des fibres amyloïdes. Le composé possédant un groupement méthyle au niveau de la glycine 33 est le plus efficace pour empêcher la fibrillation de l'Aβ et désassembler des fibres préformées à un ratio équimolaire (Aβ/peptide). Ce composé permet également de réduire la toxicité cellulaire causée par la fibrillation de l'Aβ. Les autres composés dans lesquels les groupes méthyles sont introduits à d'autres positions possèdent une activité réduite. Plus particulièrement le composé méthylé sur la liaison amide de la glycine 25 forme des fibres toxiques pour les cellules. D'après cette étude la région 29-34 semble être essentielle pour la formation de fibres amyloïdes.

165. Matharu, B.; El-Agnaf, O.; Razvi, A.; Austen, B. M., Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs for β-amyloid in Alzheimer's disease. *Peptides* **2010**, 31 (10), 1866-1872.

166. Taylor, M.; Moore, S.; Mayes, J.; Parkin, E.; Beeg, M.; Canovi, M.; Gobbi, M.; Mann, D. M. A.; Allsop, D., Development of a Proteolytically Stable Retro-Inverso Peptide Inhibitor of β-Amyloid Oligomerization as a Potential Novel Treatment for Alzheimer's Disease. *Biochemistry* **2010**, 49 (15), 3261-3272.

167. Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J., Inhibition of Toxicity in the β-Amyloid Peptide Fragment β-(25-35) Using N-Methylated Derivatives: A general strategy to prevent amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (33), 25109-25115.

Cette approche a également été utilisée avec le peptide KLVFFAE¹⁶⁸. Les liaisons peptidiques de cette séquence sont méthylées de façon alternée ou consécutive. L'inhibiteur le plus efficace est le peptide A β _{16-22m}, NH₂-KL(Me-V)V(Me-F)F(Me-A)E-CONH₂, qui possède des groupes méthyles en positions alternées. Ce composé permet de prévenir la formation de fibres amyloïdes et de les désassembler aussi efficacement que le peptide Ac-A β ₁₆₋₂₂-CONH₂. De plus, contrairement à son homologue non méthylé, le peptide A β _{16-22m} est résistant aux protéases testées, hautement soluble en milieu aqueux et possède une structure stable proche d'un feuillet β . Ce composé possède deux faces : une non méthylée lui permettant la reconnaissance du peptide cible A β et une autre, méthylée empêchant l'addition d'un autre brin β par formation de liaisons hydrogènes. Sa structuration en feuillet β permet également de gêner l'élongation des fibres de peptide A β . Ce composé est également plus hydrophobe que le peptide A β ₁₆₋₂₂ et est supposé plus apte à traverser la BHE. En revanche le composé possédant des liaisons peptidiques méthylées consécutivement ne présente pas d'activité inhibitrice de la fibrillogénèse de l'A β . Enfin, l'activité inhibitrice est séquence dépendante car un analogue méthylé de la protéine humaine du Prion n'a aucun effet sur la fibrillation de l'A β .

Kokkoni et al¹⁶⁹ se sont intéressés à l'influence du nombre et du positionnement des méthylations dans la séquence KLVFFA. Les auteurs ont également étudié la possibilité de réduire le nombre d'acides aminés des inhibiteurs Ac-A β _{16-22m} et iA β 5 ainsi que leur remplacement par des résidus modifiés pour améliorer leurs propriétés pharmacologiques. Les inhibiteurs sont synthétisés en série D afin d'augmenter leur résistance aux protéases. Plusieurs cycles de sélection sont réalisés en utilisant des tests biologiques différents (ThT, microscopie électronique, toxicité cellulaire). Les composés les plus efficaces possèdent une chiralité D, ont une extrémité N-terminale libre mais sont amide à leur extrémité C-terminale et possèdent des chaînes encombrées et branchées en positions 1 et 4 de la séquence KLVFF. Une seule liaison peptidique méthylée en positions 1 et/ou 5 suffit à fournir une activité inhibitrice. Ainsi un composé est sélectionné, le D-[(ChGly)-(Tyr)-(ChGly)-(mLeu)]-NH₂ (ChGly=cyclohexylglycine). Ce composé possède une activité supérieure au peptide D-[(mL)VFFL]-NH₂ tandis que le peptide iA β 5 ne possède pas de pouvoir inhibiteur à de faibles ratios molaires 1:1 ou 1:2 (peptide/A β) dans les tests utilisés pour cette étude.

168. Sciarretta, K. L.; Boire, A.; Gordon, D. J.; Meredith, S. C., Spatial Separation of β -Sheet Domains of β -Amyloid: Disruption of Each β -Sheet by N-Methyl Amino Acids†. *Biochemistry* **2006**, 45 (31), 9485-9495.

169. Kokkoni, N.; Stott, K.; Amijee, H.; Mason, J. M.; Doig, A. J., N-Methylated Peptide Inhibitors of β -Amyloid Aggregation and Toxicity. Optimization of the Inhibitor Structure†. *Biochemistry* **2006**, 45 (32), 9906-9918.

Gordon et al¹⁷⁰ ont comparé l'introduction de liaisons esters (Aβ16-20e) avec celle de groupes méthyles (Aβ16-20m) en positions alternées dans la séquence Aβ16-20 KLVFF au niveau des liaisons peptidiques (Fig. 35). Ces liaisons permettent de conserver la géométrie infligée par une liaison amide mais ne peuvent pas s'engager dans une liaison hydrogène. Ainsi comme précédemment une face est disponible pour la reconnaissance de l'Aβ et une face est bloquée pour l'extension de la fibrillation par réseau de liaisons hydrogènes. Le composé Aβ16-20e est aussi efficace que son analogue N-méthylé (Aβ16-20m) en tant qu'inhibiteur de la fibrillogénèse de l'Aβ. Cependant les liaisons esters sont sensibles à l'hydrolyse pour un pH supérieur à 7 ce qui rend ce composé inutilisable *in vivo*.

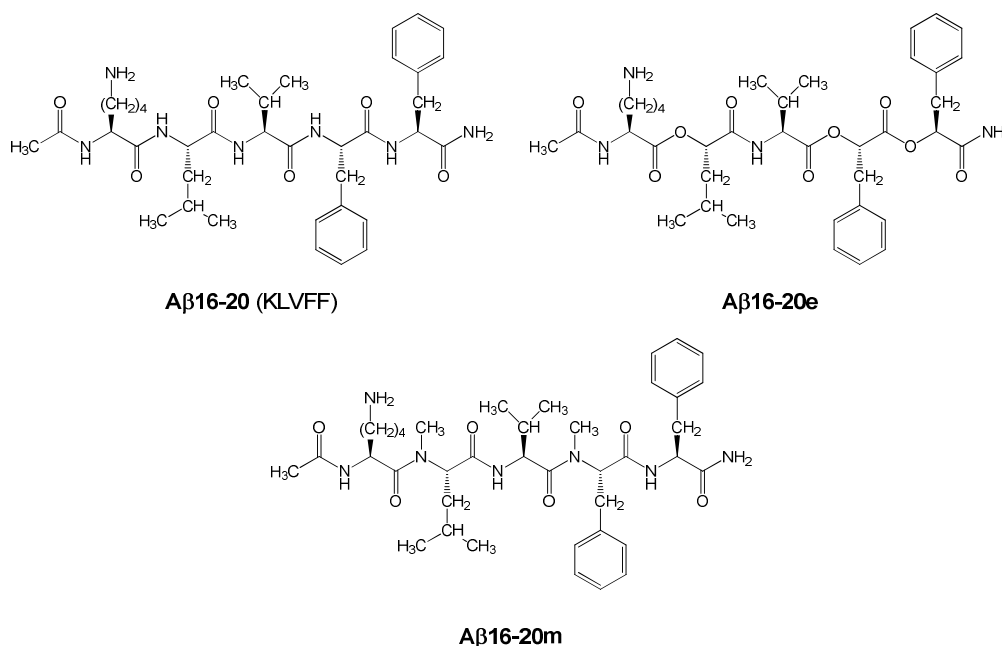


Fig. 35. Structures des peptides testés par Gordon et al¹⁷⁰

Une autre approche dérivée pour concevoir des inhibiteurs associe un élément de reconnaissance pour se lier spécifiquement avec l'Aβ, comme ceux décrits précédemment, avec un élément perturbateur pour interférer avec l'auto-assemblage des fibrilles et donc empêcher l'agrégation en fibres. Les travaux de Ghanta et al¹⁷¹ illustrent la conception de ce type de composés. Les auteurs ont ajouté six résidus lysines aux extrémités C ou N-terminales de la séquence Aβ₁₅₋₂₅. Le composé possédant ces résidus chargés à son extrémité C-terminale accélère la formation des fibres mais réduit la toxicité de l'Aβ dans les cellules (pour un ratio molaire 1:2 Aβ/peptide). Le composé possédant un hexamère de lysines à son extrémité N-terminale précipite dès qu'il est mis

170. Gordon, D. J.; Meredith, S. C., Probing the Role of Backbone Hydrogen Bonding in β-Amyloid Fibrils with Inhibitor Peptides Containing Ester Bonds at Alternate Positions. *Biochemistry* **2002**, 42 (2), 475-485.

171. Ghanta, J.; Shen, C. L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M., A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity. *J Biol Chem* **1996**, 271 (47), 29525-8.

Hammer et col.¹⁷⁴ ont développé des composés basés sur le cœur KLVFF avec un élément perturbateur polylysine mais dans lequel des acides aminés α,α -substitués sont introduits en positions alternées dans la séquence de reconnaissance (Fig. 36). Ces positions correspondent à la face du peptide impliquée dans les liaisons hydrogènes avec un autre brin β et devrait donc empêcher l'ajout de ce dernier. De plus, ces composés possédant des carbones à « deux chaînes latérales » (introduction d'une deuxième chaîne latérale similaire sur le carbone α) permettent une meilleure stabilisation de la conformation des peptides que celle obtenue avec des groupements méthyles.

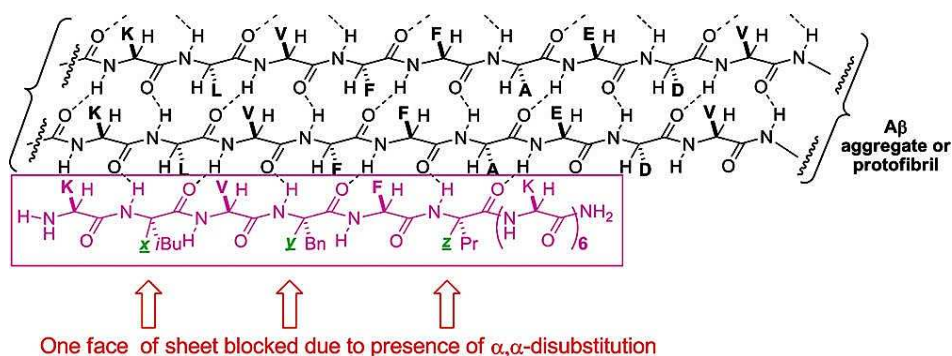


Fig. 36. Inhibiteurs possédant des acides aminés α,α -disubstitués¹⁷⁶

- 69

Le composé possédant la séquence polylysine à son extrémité N-terminale, AMY-2, précipite rapidement dans le tampon PBS et de larges agrégats non fibrillaires sont observés dans les études de microscopie en présence de l'A β (ratio molaire 1:1 A β /peptide). Par contre, l'attachement d'un hexamère de lysine à l'extrémité C-terminale donne un bon inhibiteur, AMY-1, de la formation des fibres d'après les études microscopiques : très peu de fibrillation est observée même pour un faible ratio 10:1 (A β /peptide). Les mêmes auteurs avec l'équipe de Dave¹⁷⁵ ont évalué l'effet d'AMY-1 *in vivo* par injection dans l'hippocampe de souris modèles. Ils ont constaté une diminution du nombre de dépôts amyloïdes dans la zone d'injection mais le composé s'avère toxique à haute dose. Afin d'améliorer la biodisponibilité de ce produit, le poids moléculaire et le nombre de charges doivent être diminués. Ainsi, récemment Bett et al¹⁷⁶ se sont intéressés à l'influence du positionnement et du nombre d' α,α -acides aminés nécessaires dans la séquence de reconnaissance pour étudier la possibilité de diminuer la masse molaire de AMY-1. La plupart des composés possédant un ou deux α,α -acides aminés empêchent la formation des fibres et détruisent les fibres préformées d'après les expériences de fluorescence (ThT) et de microscopie à force atomique réalisées. Les structures du peptide A β observées en microscopie à force atomique (AFM) en présence de ces composés correspondent à des agrégats sphériques non fibrillaires de morphologies et de tailles différentes selon le nombre d' α,α -acides aminés introduits. La neurotoxicité du peptide A β dépend de la taille et de la forme des agrégats amyloïdes. Ainsi les inhibiteurs conçus dans cette étude pourrait moduler voir empêcher la toxicité du peptide A β dans les neurones. Simultanément dans une autre publication Bett et al¹⁷⁷ ont testé l'influence du nombre et de la nature des charges introduites dans ce type de composés. Réduire la charge apportée par l'hexamère de lysines permettrait non seulement d'améliorer la biodisponibilité des composés mais aussi leur passage de la BHE. Les auteurs se sont basés notamment sur les travaux d'Austen et col.¹⁶⁴ en ajoutant des motifs RG-/-GR à la séquence KLVFF. Une série de peptides a ainsi été conçue en faisant varier, par exemple, la polarité des groupes aux extrémités C- et/ou N-terminales, ou en incorporant un ou deux groupes mini PEG. Les peptides OR1 (RGKLVFFGR), et A β _{16-22m} (K(Me)LV(Me)FF(Me)AE), servent de références. Les composés les plus aptes à empêcher la fibrillation de l'A β ₄₀ à un ratio équimolaire possèdent un groupe chargé à

175.Li, Q.; Gordon, M.; Etienne, M. A.; Hammer, R. P.; Morgan, D., Contrasting In Vivo Effects of Two Peptide-Based Amyloid-Protein Aggregation Inhibitors in a Transgenic Mouse Model of Amyloid Deposition. *Cell Transplant.* **2008**, *17* (4), 397-408.

176.Bett, C. K.; Ngunjiri, J. N.; Serem, W. K.; Fontenot, K. R.; Hammer, R. P.; McCarley, R. L.; Garno, J. C., Structure-Activity Relationships in Peptide Modulators of β -Amyloid Protein Aggregation: Variation in α,α -Disubstitution Results in Altered Aggregate Size and Morphology. *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1* (9), 608-626.

177.Bett, C. K.; Serem, W. K.; Fontenot, K. R.; Hammer, R. P.; Garno, J. C., Effects of Peptides Derived from Terminal Modifications of the A β Central Hydrophobic Core on A β Fibrillization. *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1* (10), 661-678.

leurs extrémités N-terminales (GR ou miniPEG) ainsi qu'un ou deux α,α -acides aminés avec trois lysines aux extrémités C et/ou N-terminales. Ces composés peuvent également désassembler des fibres d'A β préformées. Les structures du peptide A β observées en AFM en présence de ces composés sont des agrégats sphériques de tailles et de morphologies variables parfois mélangées à des structures linéaires ou des fibres.

Findeis et al.¹⁷⁸ ont recherché la séquence minimale liée à un groupe organique possédant une activité inhibitrice de la fibrillogénèse de l'A β . Les peptides les plus efficaces possèdent un acide cholique lié à leur extrémité N-terminale. Ce dernier agit comme un élément perturbateur de la fibrillogénèse du peptide et la partie peptidique constitue l'élément de reconnaissance. Ainsi l'inhibiteur choly-LVFFA est sélectionné car il possède un seul groupe ionisable et une polarité réduite. Ces dernières caractéristiques facilitent le passage de la BHE chez le rat bien qu'il soit fortement métabolisé par le foie, ce qui pourrait être problématique pour son utilisation en tant qu'agent thérapeutique. Ce composé inhibe la formation des fibres (inhibition autour de 60%) à un ratio équimolaire (A β /peptide). Pour améliorer la stabilité *in vivo* dans le liquide cébrospinal du singe, ses analogues de configuration D (extrémité C-terminale libre ou amide) ont été testés. L'activité inhibitrice de la fibrillogénèse est conservée et les deux composés sont stables à la protéolyse. Le même type de travail a été réalisé récemment par Wei et al.¹⁷⁹ en greffant un ferrocène à l'extrémité N-terminale du peptide KLVFF (Fc-KLVFF). Le ferrocène et ses dérivés possèdent plusieurs propriétés médicinales (antibactérienne, antitumorale...). Le composé Fc-KLVFF permet d'inhiber complètement la fibrillogénèse de l'A β_{42} à un ratio 4:1 (peptide/A β). Dans cette étude l'activité de ce composé est similaire à celle du peptide KLVFF. D'après la cinétique de fibrillation de l'A β_{42} , l'IC₅₀ est estimée à 0,18 μ M pour le composé Fc-KLVFF et 0,33 μ M pour le peptide KLVFF. Pour ces deux composés à un ratio molaire 4:1 peptide/A β des agrégats sphériques (de plus petites tailles pour le peptide KLVFF seul) sont observés en AFM mais aucune structure fibrillaire n'est présente. Cependant la faible solubilité du Fc-KLVFF en milieu aqueux limite son utilisation en tant qu'agent thérapeutique. C'est pourquoi, récemment le composé Fc-KLVFF(K₆) a été développé¹⁸⁰. Il est soluble dans l'eau et permet d'inhiber la fibrillation du peptide A β_{42} en proportion substochiométrique.

178.Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamin, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J.-J.; Chin, J.; Kelley, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M., Modified-Peptide Inhibitors of Amyloid β -Peptide Polymerization. *Biochemistry* **1999**, 38 (21), 6791-6800.

179.Wei, C.-W.; Peng, Y.; Zhang, L.; Huang, Q.; Cheng, M.; Liu, Y.-N.; Li, J., Synthesis and evaluation of ferrocenoyl pentapeptide (Fc-KLVFF) as an inhibitor of Alzheimer's A β 1–42 fibril formation in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (19), 5818-5821.

180.Zhang, L.; Yagnik, G.; Peng, Y.; Wang, J.; Howard Xu, H.; Hao, Y.; Liu, Y.-N.; Zhou, F., Kinetic Studies of Inhibition of the A β (1–42) Aggregation Using a Ferrocene-tagged β -Sheet Breaker Peptide. *Anal. Biochem.* **2012**.

Enfin, Hochdörffer et al¹⁸¹ ont conçu par modélisation moléculaire des ligands basés sur un trimère d'aminopyrazole comportant une fonction acide carboxylique permettant la liaison de groupes polaires, très polaires et apolaires. Le cœur aminopyrazole peut se lier à la séquence KLVFF de l'Aβ₄₂ par formation d'un réseau de liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes entre le noyau pyrazole et les résidus phénylalanines. Plusieurs des composés synthétisés permettent d'inhiber la fibrillation de l'Aβ₄₂ *in vitro*, de désassembler des fibres préformées et diminuer la toxicité cellulaire induite par l'Aβ₄₂. Un des ligands les plus prometteurs est le Trim-LPFFD-OH comportant le peptide briseur de feuillets β LPFFD développé par Soto¹⁶⁰ (Fig. 37).

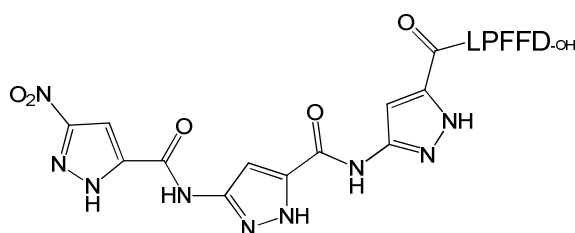


Fig. 37. Structure du Trim-LPFFD

Pour un ratio 1:6 (Aβ₄₂/inhibiteur), il permet d'inhiber à 70% la formation des fibres de l'Aβ₄₂ et de les désassembler à 60%. Dans les cellules, le Trim-LPFFD-OH permet d'obtenir 97% de cellules viables (contre 75% avec l'Aβ₄₂) avec une IC₅₀ de 3,1 μM.

II.1.1.2. Inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau

Contrairement à l'Aβ, peu d'inhibiteurs de nature peptidique ont été décrits pour l'agrégation de la protéine tau. A notre connaissance, tous les travaux connus à ce jour sont énoncés dans ce paragraphe.

Sievers et al¹⁸² ont développé une méthodologie computationnelle pour concevoir des peptides inhibiteurs sans connaître la structure complète de la protéine à amylose. Cette méthode se base sur la séquence peptidique minimale nécessaire à la formation de feuillets β impliqués dans la formation des fibres amyloïdes. Cette méthode a été appliquée à la protéine tau à partir de la séquence VQIVYK (tau₃₀₆₋₃₁₁). Les auteurs ont ensuite conçus par modélisation moléculaire des peptides comportant des acides aminés de configuration D pouvant interagir avec cet hexapeptide. Leur activité inhibitrice de la fibrillation du peptide Ac-VQIVYK-CONH₂, des mutants K12 et K19 a été testée. Le peptide

181.Hochdörffer, K.; März-Berberich, J.; Nagel-Steger, L.; Epple, M.; Meyer-Zaika, W.; Horn, A. H. C.; Sticht, H.; Sinha, S.; Bitan, G.; Schrader, T., Rational Design of β-Sheet Ligands Against Aβ₄₂-Induced Toxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (12), 4348-4358.

182.Sievers, S. A.; Karanicolas, J.; Chang, H. W.; Zhao, A.; Jiang, L.; Zirafi, O.; Stevens, J. T.; Munch, J.; Baker, D.; Eisenberg, D., Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* **2011**, 475 (7354), 96-100.

D-tlkivw possède la meilleure activité inhibitrice de la formation de fibres. Il permet de retarder la fibrillation en augmentant le temps de latence et en diminuant la vitesse d'élongation des fibres. Ce peptide présente une spécificité pour la séquence VQIVYK car il ne bloque pas la fibrillation de l'Aβ, les peptides « scrambled » n'ont pas d'activité et son énantiomère L est moins efficace.

Le second exemple est une série de macrocycles peptidiques développée par Zheng et al¹⁸³. La structure générale de ces composés est présentée ci-dessous (Fig. 38). Les trois peptides permettant d'inhiber la fibrillation du peptide Ac-VQIVYK-NH₂ (Ac-PHF6) dans les conditions expérimentales de ces travaux sont également représentés.

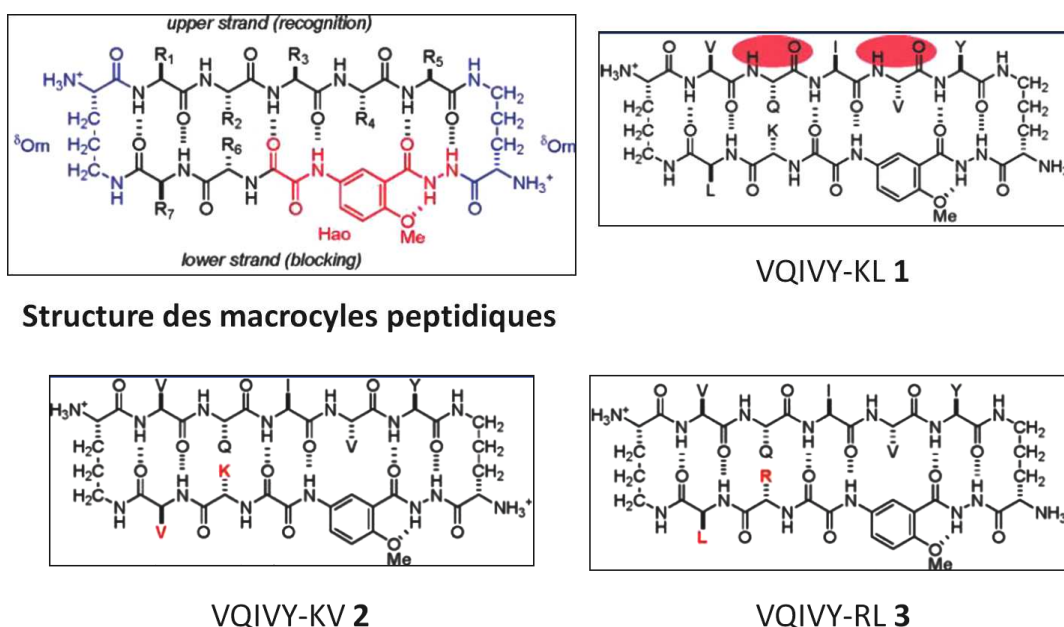


Fig. 38. Structure des macrocycles inhibiteurs de la fibrillation du peptide Ac-PHF6¹⁸³

Le peptide Ac-PHF6 est utilisé comme modèle de l'agrégation de la protéine tau. Il permet de former des fibres amyloïdes similaires à celles formées par la protéine tau entière. Les macrocycles sont composés d'un brin supérieur correspondant à cinq acides aminés (R1-R5) et d'un brin inférieur correspondant à l'acide aminé modifié « Hao » (Fig. 38) et deux acides aminés (R6-R7). Les deux brins sont reliés par deux ornithines liées en gamma permettant d'induire une structure en feuillet β. L'acide aminé modifié Hao permet de former des liaisons hydrogènes intramoléculaires avec le brin supérieur pour former un feuillet β tout en bloquant les liaisons hydrogènes du brin inférieur avec un brin additionnel. Le brin supérieur des trois composés actifs possède le pentapeptide VQIVY. Les groupes R6 et R7 possèdent la même polarité que R1 et R2. Par exemple, si la

183. Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S., Macrocylic β-Sheet Peptides That Inhibit the Aggregation of a Tau-Protein-Derived Hexapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (9), 3144-3157.

lysine et la leucine du brin inférieur du macrocycle **1** sont inversées, une perte du potentiel d'inhibition est observée. Il en est de même pour les macrocycles **2** et **3**. De la même façon, une perte d'activité est observée si la séquence du brin supérieur est QIVYK, si le cycle contient une ornithine α -liée ou si un azote d'un lien amide du brin supérieur est méthylé. Le macrocycle **1** permet d'augmenter le temps de latence de la fibrillation du peptide Ac-PHF6 pour un ratio 2:1 (Ac-PHF6/**1**) et inhibe totalement la fibrillation pour un ratio 1:1 (Ac-PHF6/**1**) dans les conditions expérimentales utilisées. Les macrocycles **2** et **3** permettent de retarder la fibrillation pour un ratio 4:1 (Ac-PHF6/macrocycle) et inhibe la totalité de la fibrillation pour des ratios 2:1 (Ac-PHF6/**2**) et 3:1 (Ac-PHF6/**3**). L'effet de la concentration sur le temps de latence n'est pas linéaire ce qui suggère un mode de liaison coopératif des inhibiteurs. Les différents résultats obtenus lors de ces travaux ont permis d'établir un modèle expliquant le mécanisme d'inhibition (Fig. 39).

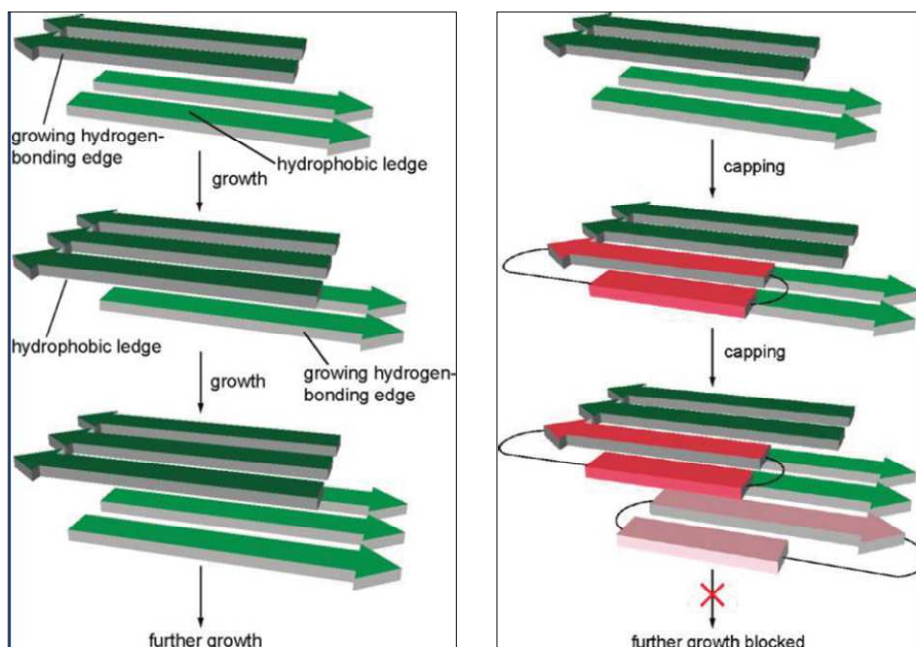


Fig. 39. Mécanisme proposé pour la formation des fibres d'Ac-PHF6 (à gauche) et pour son inhibition par les macrocycles (à droite)¹⁸³

Dans ce modèle, les brins de chaque couche de feuillet β s'ajoutent de façon alternative créant à chaque addition d'un brin une nouvelle cavité hydrophobe et un nouveau côté accepteur/donneur de liaisons hydrogènes (Fig. 38). Le macrocycle viendrait se placer à la place du brin additionnel *via* son brin supérieur tandis que le brin inférieur empêcherait l'ajout d'un brin supplémentaire sur cette couche (Fig. 39). Une cavité hydrophobe est créée et une face est disponible sur la seconde couche pour l'ajout d'un autre brin par formation de liaisons hydrogènes. Un autre macrocycle s'ajouterait à ce niveau pour bloquer totalement la croissance du feuillet β .

II.1.2. Inhibiteurs hétéroaromatiques

L'inhibition de la fibrillogénèse des peptides et protéines amyloïdes par de petites molécules est une des stratégies thérapeutiques les plus étudiées. Un grand nombre de ces molécules sont des hétérocycles aromatiques. Ces composés sont le plus souvent non spécifiques d'un peptide ou d'une protéine amyloïde.

II.1.2.1. Inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'A β ₄₀

Un grand nombre de molécules est décrit dans la littérature. Seuls plusieurs exemples des grandes familles de molécules seront détaillés dans cette partie.

A. Colorants

Le rouge Congo est le premier colorant qui a été décrit pour se lier spécifiquement aux fibres amyloïdes. Plusieurs études ont montré que ce colorant sulfonaté se lie aux peptides A β et qu'il inhibe la formation des fibres du peptide A β ₄₀ (IC₅₀=0,9 μ M, Masuda et al.¹⁸⁴). Il permet également de réduire la neurotoxicité induite par les peptides A β dans des modèles cellulaires¹⁸⁵ ou dans l'hippocampe chez le rat. Ce composé inhibe également la fibrillation de la protéine tau (IC₅₀=2,2 μ M) et de la conversion du Prion (IC₅₀=2,3 μ M)¹⁸⁴. Cependant, le rouge Congo est potentiellement toxique et ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, récemment des résultats contradictoires sur l'activité du rouge Congo ont été publiés^{186,187}. Pour Buell et al.¹⁸⁶, ce composé n'inhibe pas la fibrillation de l'A β mais déplace la ThT de son site de liaison au peptide A β . Grelle et al.¹⁸⁷ ont obtenus des résultats similaires : le rouge Congo n'a pas d'effet sur l'agrégation des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ et ne permet de diminuer la toxicité du peptide A β ₄₀ dans les cultures cellulaires. D'autres molécules dérivées du rouge Congo ont également été étudiées. La chrysamine G, un dérivé du rouge Congo plus petit et plus lipophile, passe la BHE, peut bloquer la fibrillation du peptide A β et réduire sa toxicité (Fig. 40)¹⁸⁸. Un autre dérivé sulfonaté du rouge Congo, le chlorazol black E (Fig. 40), est

184.Masuda, M.; Suzuki, N.; Taniguchi, S.; Oikawa, T.; Nonaka, T.; Iwatsubo, T.; Hisanaga, S.-i.; Goedert, M.; Hasegawa, M., Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochemistry* **2006**, 45 (19), 6085-6094.

185.Lorenzo, A.; Yankner, B. A., β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91 (25), 12243-12247.

186.Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P.; Welland, M. E., Interactions between amyloidophilic dyes and their relevance to studies of amyloid inhibitors. *Biophys. J.* **2010**, 99 (10), 3492-3497.

187.Grelle, G.; Otto, A.; Lorenz, M.; Frank, R. F.; Wanker, E. E.; Bieschke, J., Black tea theaflavins inhibit formation of toxic amyloid- β and α -synuclein fibrils. *Biochemistry* **2011**, 50 (49), 10624-10636.

188.Hawkes, C. A.; Ng, V.; McLaurin, J., Small molecule inhibitors of A β -aggregation and neurotoxicity. *Drug Dev. Res.* **2009**, 70 (2), 111-124.

décrit comme étant un bon inhibiteur de la formation des fibres d'A β ($IC_{50}=0,3\text{ }\mu\text{M}$)^{184,189}. Ce composé n'inhibe pas la fibrillation de la protéine tau ($IC_{50}>200\text{ }\mu\text{M}$)¹⁸⁴.

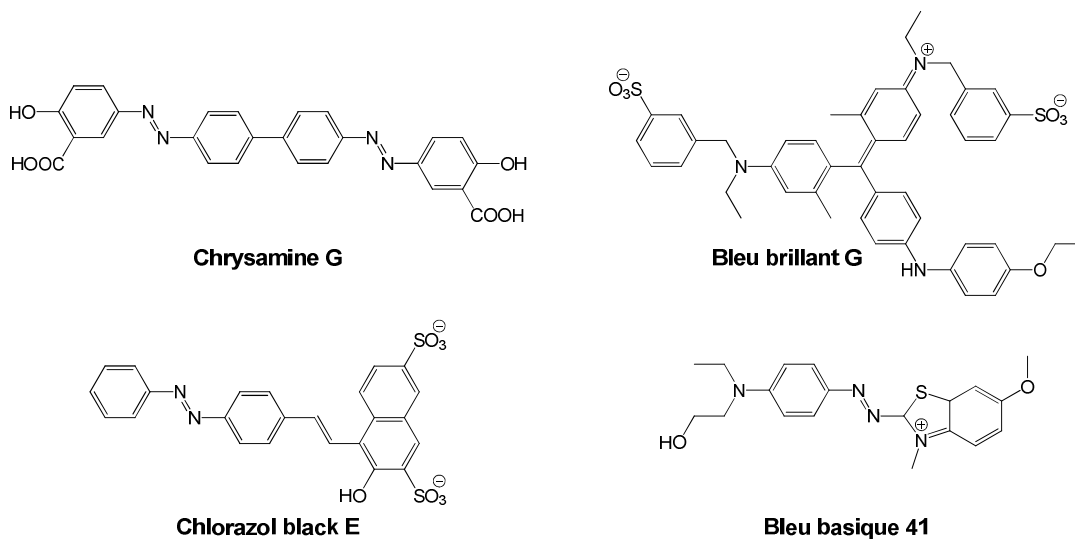


Fig. 40. Exemples de colorants inhibiteurs de la fibrillation du peptide A β

D'autres colorants sulfonatés sont décrits dans la littérature. Par exemple, Wong et al¹⁹⁰ ont montré que le bleu brillant G, un colorant triphénylméthane est aussi un inhibiteur de la fibrillation de l'A β_{40} (Fig. 40). Ce composé est un dérivé du bleu brillant FCF qui est un colorant alimentaire approuvé par la FDA donc non toxique et qui passe la BHE. Le bleu brillant G permet de convertir les oligomères solubles du peptide A β_{40} en agrégats non-toxiques pour des neurones en culture. Il est actif pour des concentrations inférieures au micromolaire. Ces résultats supportent l'hypothèse que la modulation de la fibrillation avec de petites molécules en formant des espèces pour une « voie off » de fibrillation pourrait être une stratégie envisageable en thérapie.

La thioflavine T est un autre colorant, de la famille des benzothiazoles, également connu pour se lier spécifiquement aux fibres amyloïdes et plus précisément aux feuillets β croisés. Ainsi plusieurs composés de cette famille ont été évalués en tant qu'inhibiteur de la formation des fibres des peptides A β . Le bleu basique 41 (Fig. 40) en fait partie ($IC_{50}=1,4\text{ }\mu\text{M}$)^{184,189}. Plusieurs benzothiazoles ont été testés et inhibent la fibrillation du peptide A β_{40} mais pas celle de la protéine tau ni la conversion du Prion^{184,189}.

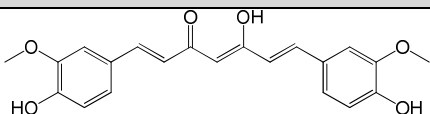
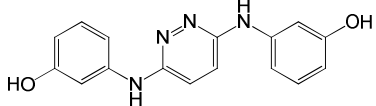
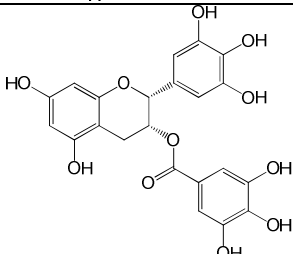
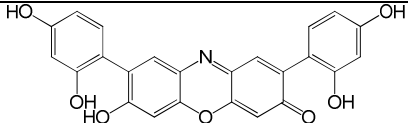
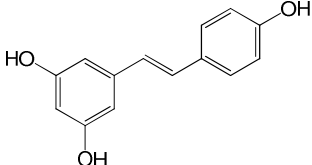
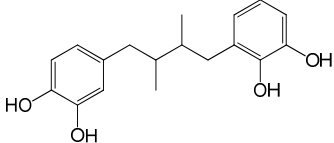
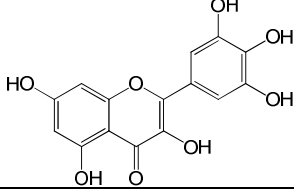
189.Taniguchi, S.; Suzuki, N.; Masuda, M.; Hisanaga, S.-i.; Iwatsubo, T.; Goedert, M.; Hasegawa, M., Inhibition of Heparin-induced Tau Filament Formation by Phenothiazines, Polyphenols, and Porphyrins. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (9), 7614-7623.

190.Wong, H. E.; Qi, W.; Choi, H.-M.; Fernandez, E. J.; Kwon, I., A safe, blood-brain barrier permeable triphenylmethane dye inhibits amyloid- β neurotoxicity by generating nontoxic aggregates. *ACS Chem Neurosci* **2011**, 2 (11), 645-657.

B. Polyphénols

Les polyphénols regroupent de nombreuses molécules synthétiques ou naturelles possédant deux groupes phénoliques ou plus. Ils possèdent des activités biologiques et variées (antioxydants, antibiotiques...) et plusieurs de ces composés ont été identifiées comme inhibiteurs de la fibrillation de fibres amyloïdes dont le peptide A β ₄₀^{184,189,191}. Quelques exemples de polyphénols sont présentés dans le tableau ci-dessus (Tabl. 5-) ainsi que leurs IC₅₀ déterminées *in vitro*.

Tabl. 5- Exemples de polyphénols testés sur la fibrillation des peptides A β

Nom	Structure	Inhibition <i>in vitro</i> : IC ₅₀ (n.d.=non déterminée)
Curcumin		A β ₄₀ =0,19 μ M ¹⁹² A β ₄₂ =0,63 μ M ¹⁹²
RS-0406		n.d.
(-) EGCG		A β ₄₀ =2 μ M ¹⁸⁴
O4 (dérivé de l'Orcéine)		n.d.
Resveratrol		n.d.
NDGA		A β ₄₀ =0,14 μ M ²⁰² A β ₄₂ =0,86 μ M ²⁰²
Myricétine		A β ₄₀ =0,29 μ M ²⁰² A β ₄₂ =0,4 μ M ²⁰²

191.Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E., Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem. Biol. Drug Des.* **2005**, 67 (1), 27-37.

Le curcumin est un des polyphénols les plus étudiés en tant qu'inhibiteurs de la fibrillation de l'Aβ^{192,193,194,195} (Tabl. 5-). Le curcumin est une épice particulièrement utilisée en Asie dans l'alimentation et en tant que remède. Cette épice se compose d'un mélange de composés : le curcumin (75-80%), le déméthoxycurcumin (15-20%) et le bisdéméthoxycurcumin (3-5%)¹⁹⁶. Le curcumin a des propriétés bénéfiques en tant qu'antioxydant, anti-inflammatoire et anti-tumoral. Dans une étude *in vitro* de Ono et al¹⁹², le curcumin inhibe la formation des fibres des peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ (IC₅₀=0,19 et 0,63 μM, respectivement), leur élongation (IC₅₀=0,19 et 0,52 μM) et déstabilise les fibres préformées (DC₅₀=0,42 et 0,32 μM). Yang et al¹⁹³ ont montré que le curcumin inhibe l'agrégation de l'Aβ₄₀ *in vitro* (IC₅₀=0,8 μM), désagrège les fibres préformées (DC₅₀=1 μM), empêche la formation d'oligomères et diminue la toxicité de l'Aβ₄₀ à des concentrations allant de 0,1 à 1 μM. Cependant, dans les travaux de Necula et al¹⁹⁷ le curcumin inhibe l'oligomérisation de l'Aβ mais n'inhibe pas sa fibrillation *in vitro* pour des concentrations entre 30 et 300 μM. La disparité des résultats obtenus pourrait être dues aux concentrations et conditions expérimentales utilisées dans les différentes études. Enfin, Narlawar et al¹⁹⁵ ont testé le curcumin ainsi que des dérivés isoxazoles et pyrazoles sur l'agrégation de la protéine tau, de l'Aβ₄₂ et sur la sécrétion de peptides Aβ dans des cellules. Le curcumin n'inhibe pas la fibrillation de la protéine tau ni désassemble ses fibres préformées et n'a pas d'effet sur la sécrétion d'Aβ dans les cellules. La modification de la fonction céto-énolique par un cycle isoxazole ne change pas l'affinité pour l'Aβ₄₂ (IC₅₀=0,11 μM), ni l'activité sur les fibres de tau mais permet d'inhiber la sécrétion de peptides Aβ. L'alkylation des groupes hydroxyles des motifs phénols de ce dérivé résulte en une perte d'activité pour tous les paramètres testés. La modification de la fonction céto-énolique du curcumin par un cycle pyrazole aboutit à un dérivé capable d'inhiber la fibrillation de tau (IC₅₀=34 μM), de désassembler les fibres de tau préformées (DC₅₀=17 μM), diminue l'affinité pour l'Aβ₄₂ (IC₅₀=0,48 μM) et la sécrétion de peptides Aβ dans les cellules. L'alkylation du cycle pyrazole permet de diminuer davantage l'affinité pour l'Aβ₄₂

192.Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M., Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* **2004**, 75 (6), 742-750.

193.Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kayed, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A., Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (7), 5892-5901.

194.Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M., Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63 (13), 1538-1552.

195.Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B., Curcumin-Derived Pyrazoles and Isoxazoles: Swiss Army Knives or Blunt Tools for Alzheimer's Disease? *ChemMedChem* **2008**, 3 (1), 165-172.

196.Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M., Review: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* **2010**, 16 (5), 285-297.

197.Necula, M.; Kaye, R.; Milton, S.; Glabe, C. G., Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid β oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (14), 10311-10324.

($IC_{50} > 1 \mu M$), de conserver l'activité envers la protéine tau et la sécrétion de peptides A β dans les cellules. Des études *in vivo* ont également été réalisées avec le curcumin. Dans des modèles de souris transgéniques le curcumin passe la BHE, marque les plaques amyloïdes, diminue le taux de peptides A β et le stress du aux plaques^{193,198}. Cependant d'autres études chez le rat indiquent que la biodisponibilité du curcumin est faible et que de hautes doses sont nécessaires pour le détecter dans les tissus¹⁹⁶. Ceci est attribué au métabolisme important de ce composé dans le système digestif. Dans des modèles de souris transgéniques possédant les pathologies A β et tau, l'administration orale du curcumin permet de diminuer la phosphorylation de tau ce qui s'accompagne d'une amélioration des déficits du comportement. Enfin, des études cliniques sont menées chez l'homme et les résultats parus montrent qu'il n'y pas de réelle amélioration des fonctions cognitives chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer traités avec le curcumin. Des études cliniques supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'efficacité de ce composé en thérapie.

De nombreux polyphénols possédant une activité sur la fibrillation des peptides A β ont été identifiés par plusieurs équipes. Par exemple, le composé RS-0406, une hydroxyaniline, inhibe *in vitro* la fibrillation du peptide A β , désassemble les fibres préformées et empêche la formation d'oligomères dans des cellules¹⁹⁹ (Tabl. 5-). L'épigallocatechine gallate (EGCG) est la principale catéchine retrouvée dans le thé vert. Elle permet d'inhiber la fibrillation de l'A β_{40} ($IC_{50} = 2 \mu M$ ¹⁸⁴) et de la protéine tau ($IC_{50} = 9,6 \mu M$ ¹⁸⁴) *in vitro*, ainsi que celle d'autres protéines amyloïdes (IAPP, transthyretine) et la conversion du prion^{184,187,191} (Tabl. 5-). L'EGCG se lie aux peptides A β non structurés et permet leur assemblage en oligomères larges et sphériques. Ces oligomères sont des espèces pour une « voie off » de fibrillation et ne sont pas toxiques pour les cellules²⁰⁰. L'EGCG permet de protéger les cellules en culture contre la toxicité de l'A β pour des concentrations de l'ordre du micromolaire¹⁸⁸. Dans des modèles de souris, l'administration de cette molécule provoque la réduction du taux de peptides A β_{40} et A β_{42} solubles et insolubles. Ce composé est actuellement testé en clinique. Grelle et al¹⁸⁷ ont montré que quatre polyphénols dérivés de l'EGCG issus du thé, nommés theaflavines, possèdent une aussi bonne activité inhibitrice que l'EGCG de la fibrillation des peptides A β_{40} et A β_{42} ainsi que de la conversion du Prion. Les auteurs ont également montré qu'un

198. Garcia-Alloza, M.; Borrelli, L.; Rozkalne, A.; Hyman, B.; Bacskaï, B., Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.* **2007**, 102 (4), 1095-1104.

199. Walsh, D. M.; Townsend, M.; Podlisny, M. B.; Shankar, G. M.; Fadeeva, J. V.; El Agnaf, O.; Hartley, D. M.; Selkoe, D. J., Certain inhibitors of synthetic amyloid β -peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* **2005**, 25 (10), 2455-2462.

200. Ehrnhoefer, D. E.; Bieschke, J.; Boeddrich, A.; Herbst, M.; Masino, L.; Lurz, R.; Engemann, S.; Pastore, A.; Wanker, E. E., EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15 (6), 558-566.

de ces composés, TF3, est moins sensible à l'oxydation de l'air ce qui pourrait être favorable pour une utilisation *in vivo*.

Necula et al¹⁹⁷ ont testé une quarantaine de composés (dont plusieurs polyphénols) déjà identifiés comme inhibiteurs de la fibrillation de l'Aβ dans la littérature dans le but d'identifier leur mécanisme d'action. Leurs résultats indiquent que les inhibiteurs peuvent être classés en trois catégories : ceux qui inhibent l'oligomérisation mais pas la fibrillation (classe I), ceux qui inhibent l'oligomérisation et la fibrillation (classe II), ceux qui inhibent la fibrillation mais pas l'oligomérisation (classe III). Plusieurs polyphénols appartiennent à la classe I dont le curcumin, l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et la myricétine (Tabl. 5-). Ces composés ont également été testés chez la souris²⁰¹. Le curcumin et la myricétine permettent d'augmenter la quantité de monomères d'Aβ et de diminuer le taux d'oligomères mais ont peu d'effet sur les dépôts amyloïdes. Le NDGA à l'inverse ne change pas le taux d'Aβ solubles mais entraîne une diminution des dépôts amyloïdes. Ces composés agissent donc sur les peptides Aβ selon des voies différentes *in vivo*. Des études antérieures avaient démontrées *in vitro* que le NDGA et la myricétine permettaient d'inhiber la formation et l'élongation des fibres des peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ ainsi que désassembler des fibres préformées^{189,202}.

La toxicité des peptides amyloïdes est supposée être provoquée par les espèces oligomériques. Ainsi plusieurs équipes ont cherché à mieux comprendre le mécanisme d'action des inhibiteurs et en particulier leur action sur les oligomères. Récemment Bieschke et al²⁰³ ont montré que l'Orcéine (un mélange de petites molécules naturelles) et une substance dérivée, l'O4 stimulent la fibrillation de l'Aβ₄₂ (Tabl. 5-). Le composé O4 s'associe préférentiellement avec des oligomères de l'Aβ₄₂ riches en feuillets β et permet de les convertir en espèces fibrillaires non toxiques. La réduction du taux d'oligomères toxiques permet de diminuer la toxicité de l'Aβ₄₂ sur des cellules. Des tests *in vivo* sont nécessaires pour démontrer l'efficacité de cette stratégie. Le même type d'étude a été réalisé avec le resveratrol par Ladiwala et al²⁰⁴. Le resveratrol permet d'inhiber l'agrégation de l'Aβ₄₂. Il convertit les oligomères solubles, les protofibrilles et les fibres d'Aβ₄₂ en espèces agrégées de haut poids moléculaire, non structurées et non-toxiques.

201.Hamaguchi, T.; Ono, K.; Murase, A.; Yamada, M., Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-β aggregation pathway. *Am. J. Pathol.* **2009**, 175 (6), 2557-2565.

202.Ono, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2003**, 87 (1), 172-181.

203.Bieschke, J.; Herbst, M.; Wiggand, T.; Friedrich, R. P.; Boeddrich, A.; Schiele, F.; Kleckers, D.; del Amo, J. M. L.; Grüning, B. A.; Wang, Q., Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β-sheet-rich amyloid fibrils. *Nat. Chem. Biol.* **2011**.

204.Ladiwala, A. R. A.; Lin, J. C.; Bale, S. S.; Marcelino-Cruz, A. M.; Bhattacharya, M.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M., Resveratrol Selectively Remodels Soluble Oligomers and Fibrils of Amyloid Aβ into Off-pathway Conformers. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (31), 24228-24237.

La même équipe a également testé sept autres composés : quatre polyphénols (myricétine, NDGA, acide tannique et picéide), une phénothiazine (bleu de méthylène) et deux benzothiazoles (benzothiazole et riluzole). Les auteurs proposent une classification des composés selon leur mode d'action sur les oligomères du peptide A β ₄₂. La classe I regroupe les molécules qui convertissent les oligomères solubles en agrégats de hauts poids moléculaires, conduisant à une « voie off » de fibrillation, et non toxiques pour les cellules. Ces espèces ne sont pas structurées. La classe I peut être divisée en deux sous groupes selon la capacité des composés à agir (IA) ou non (IB) sur les fibres. Le resveratrol, la myricétine et le NDGA appartiennent à la classe IA tandis que le benzothiazole et le riluzole appartiennent à la classe IB. La classe II correspond aux molécules qui transforment les oligomères en fibres riches en feuillets β . Le bleu de méthylène entre dans cette catégorie. Le composé O4 répond également aux critères de la classe II. Enfin, les molécules de la classe III désassemblent les oligomères solubles et les fibres en espèces de faibles poids moléculaires non-toxiques qui ne sont pas structurées. L'acide tannique et le picéide appartiennent à cette classe. Les composés des classes IA et III permettent de transformer les fibres d'A β selon des voies similaires tandis que les classes IB et II sont sélectives des oligomères.

C. Hétérocycles aromatiques

Des phénothiazines (Fig. 41) ont été identifiées comme étant des inhibiteurs de la fibrillation de l'A β ₄₀ comme par exemple le bleu de méthylène (IC₅₀=2,3 μ M), les colorants Azure A à C (IC₅₀ entre 0,2 et 0,4 μ M) et la Quinacrine (IC₅₀=8,4 μ M)¹⁸⁹. Ces composés sont également des inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau. En particulier, le bleu de méthylène est soluble en milieu aqueux, passe la BHE et est déjà utilisé en clinique¹²⁶. Necula et al²⁰⁵ et Ladiwala et al²⁰⁶ ont montré que le bleu de méthylène inhibe l'oligomérisation de l'A β ₄₂ et accélère la fibrillation de l'A β ₄₂. Cependant ces résultats sont en désaccord avec ceux de Taniguchi et al¹⁸⁹, ce qui peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes utilisées pour ces études.

205.Necula, M.; Breydo, L.; Milton, S.; Kaye, R.; van der Veer, W. E.; Tone, P.; Glabe, C. G., Methylene blue inhibits amyloid A β oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry* **2007**, 46 (30), 8850-8860.

206.Ladiwala, A. R. A.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M., Aromatic Small Molecules Remodel Toxic Soluble Oligomers of Amyloid β through Three Independent Pathways. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (5), 3209-3218.

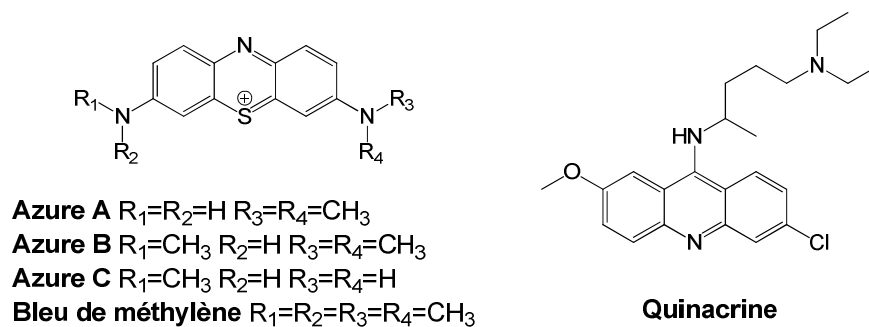


Fig. 41. Exemples de phénothiazines inhibant la fibrillation du peptide A β

Taniguchi et al¹⁸⁹ ont également décrits des porphyrines et des colorants cyanine (Fig. 42) en tant qu'inhibiteurs de la fibrillation de l'A β_{40} tels que la phthalocyanine ($IC_{50}=0,1 \mu M$) et le chlorure d'hémine ($IC_{50}=3,2 \mu M$). Les porphyrines inhibent également la fibrillation de la protéine tau. Necula et al¹⁹⁷ ont montré que l'hémine inhibe l'oligomérisation ($IC_{50}=4,8 \mu M$) et la fibrillation de l'A β_{42} *in vitro*.

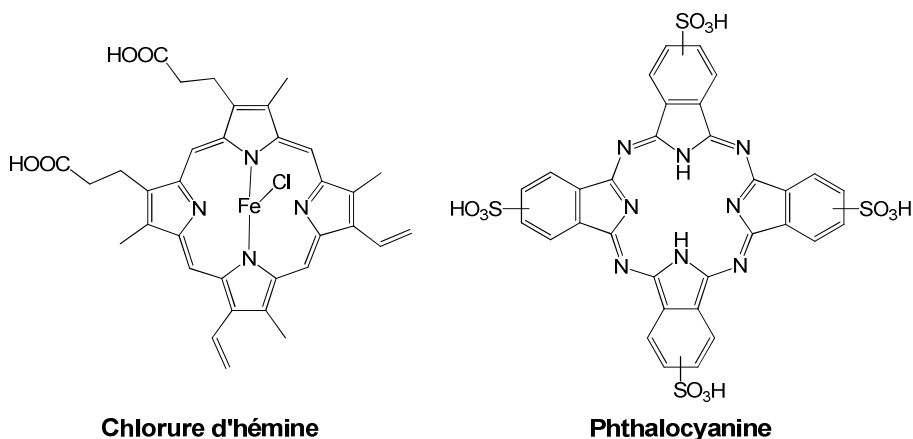


Fig. 42. Exemples d'une porphyrine et d'un colorant cyanine inhibant la fibrillation du peptide A β

D. Autres : composés non-aromatiques

Des glycoaminoglycanes (GAGs) ou des protéoglycanes sont associés à la maladie d'Alzheimer car ils sont présents dans les plaques amyloïdes et les DNF^{188,207}. L'héparane et le sulfate d'héparane permettent d'accélérer la fibrillation de l'A β *in vitro*, probablement par liaison électrostatique avec la région A β_{11-28} . Le chondroïtine sulfate favorise aussi la formation de fibres du peptide A β_{42} qui possèdent une toxicité réduite. D'autres composés sulfonatés comme l'héparine permettent d'inhiber l'interaction du sulfate d'héparane avec l'A β . Le tamiprosate (Alzhemed, acide 3-amino-propanesulfonique) est un mime de GAGs qui cible la région HHQK (A β_{13-15}) du N-terminal de l'A β . Ce composé se lie aux formes solubles des peptides A β_{40} et A β_{42} et les maintient

207.Härd, T.; Lendel, C., Inhibition of Amyloid Formation. *J. Mol. Biol.* **2012**, 421 (4–5), 441-465.

dans une forme non-fibrillaire (Fig. 43). Il diminue aussi la neurotoxicité induite par l'A β ₄₂, passe la BHE et diminue le nombre de dépôts amyloïdes et le taux d'A β ₄₀ et A β ₄₂ dans le LCR. Ce composé a été évalué en essai clinique mais a échoué en phase III.

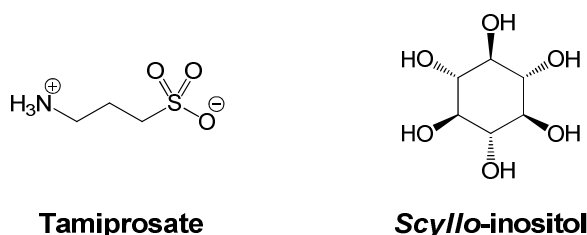


Fig. 43. Structures du tamiprosate et du scyllo-inositol

Le Scyllo-inositol est un cyclohexanol qui favorise la formation de structures en feuillets β et d'oligomères non toxiques de l'A β ₄₂ mais pas de l'A β ₄₀ (Fig. 43)^{188,207}. Ce composé agirait par compétition avec le phosphatidylinositol endogène en se liant aux deux acides aminés isoleucine et valine (A β ₄₁₋₄₂) à l'extrémité C-terminale de l'A β ₄₂. La distribution des groupes hydroxyles est importante d'après l'étude relation structure-activité. En effet les stéréoisomères *myo*- et *epi*- possèdent des activités similaires mais moins bonnes que celle du *scyllo*-inositol tandis que le *chiro*-inositol n'a pas d'activité. Ce composé est actuellement testé en clinique (phase II).

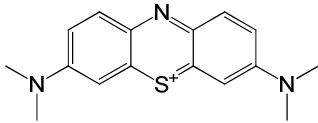
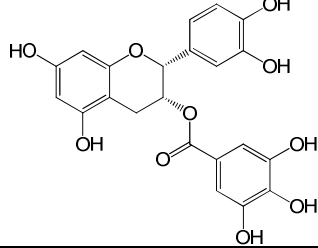
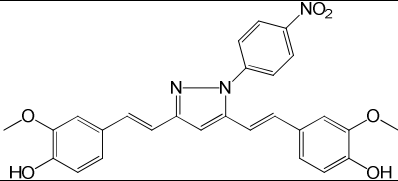
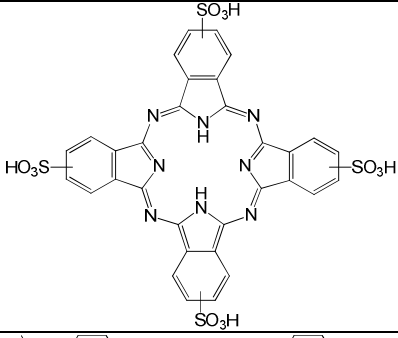
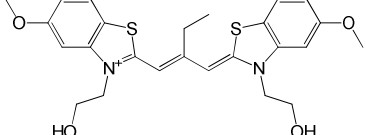
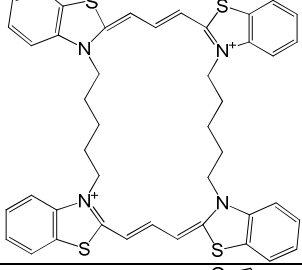
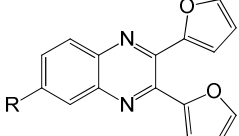
II.1.2.2. Inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau

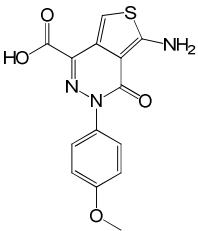
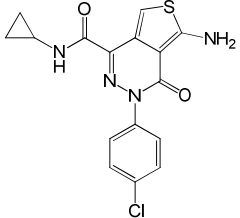
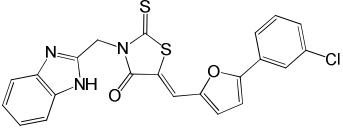
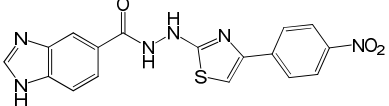
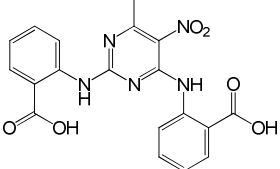
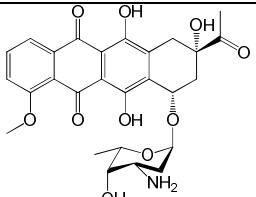
Plusieurs molécules, principalement des composés hétérocycles, sont décrites dans littérature comme inhibitrices de la fibrillation de la protéine tau^{72,208,209}. Les composés que nous avons choisi de présenter dans cette partie sont réunis dans le tableau ci-dessous (Tabl. 6-).

208.Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* **2010**, 59 (4–5), 276-289.

209.Brunden, K. R.; Ballatore, C.; Crowe, A.; Smith, A. B.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q., Tau-directed drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies: a focus on tau assembly inhibitors. *Exp. Neurol.* **2010**, 223 (2), 304-310.

Tabl. 6- Inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau

Famille	Composé	Structure	Inhibition de tau in vitro (IC ₅₀ , DC ₅₀)
Phénothiazines	Bleu de méthylène		IC ₅₀ =3,4 µM (cellules) ²¹⁰ IC ₅₀ =1,9 µM ¹⁸⁹ (fibrillation in vitro)
Polyphénols	(-) Epicatechine-5-gallate		IC ₅₀ =3 µM ¹⁸⁹
	Curcumin pyrazole		IC ₅₀ =1,2 µM ¹⁹⁵ DC ₅₀ =1,1 µM ¹⁹⁵
Porphyrines	Pthalocyanine		IC ₅₀ =3,2 µM ¹⁸⁹
Colorants cyanine	N744		IC ₅₀ =0,3 µM ²¹²
	Dimère de thiocarbocyanine		IC ₅₀ ≈80 nM ²¹⁵
Quinoxalines			IC ₅₀ ≈3 µM ²¹⁶

Aminothienopyridazines (ATPZ)	A		$IC_{50}=2,5 \mu M^{217}$
	B		$IC_{50}=8 \mu M^{219}$
Rhodanines			$IC_{50}=0,67 \mu M^{221}$ $DC_{50}=0,94 \mu M^{221}$
Phénylthiazolylhydrazides			$IC_{50}=1,6 \mu M^{222}$ $DC_{50}=0,7 \mu M^{222}$
N-phénylamines	B4A1		$IC_{50}\approx 10 \mu M^{223}$ $DC_{50}\approx 10 \mu M^{223}$
Anthraquinones	Daunorubicine		$IC_{50}= 0,1 \mu M^{211}$ $DC_{50}= 8,2 \mu M^{211}$

A. Phénothiazines, Polyphenols et Porphyrines

La première famille d'inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau, les phénothiazines (Tabl. 6-), a été décrite par Wischick et al²¹⁰. Dans cette étude une IC_{50} de $3,4 \mu M$ est déterminée *in vitro* pour le bleu de méthylène sur des cultures cellulaires. Ses dérivés méthylés (tels que la thionine, l'azure A et l'azure B, Fig. 41) sont trente fois plus efficaces avec des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire. La planéité et l'aromaticité de l'hétérocycle sont déterminantes pour l'activité inhibitrice de la fibrillation de la protéine tau. Cette première étude montre également que la thionine et l'azure A n'inhibent pas la liaison aux microtubules de la protéine tau. Taniguchi et al¹⁸⁹ obtiennent le même résultat pour le bleu de méthylène et ont montré que ce composé inhibe la fibrillation de la protéine tau avec une IC_{50} de $1,9 \mu M$. Le bleu de méthylène est déjà utilisé en clinique en tant qu'antiseptique notamment. Une étude clinique en phase II a été récemment

210. Wischick, C. M.; Edwards, P. C.; Lai, R. Y.; Roth, M.; Harrington, C. R., Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93 (20), 11213-11218.

achevée pour ce composé (nom commercial, Rember®) en tant qu'agent thérapeutique de la maladie d'Alzheimer. Les résultats montrent que les patients traités avec ce produit voient leurs capacités cognitives améliorées sur cinquante semaines contrairement à ceux traités avec le placebo. D'autres travaux ont montré que le bleu de méthylène pourrait agir au niveau d'autres processus impliqués dans la maladie d'Alzheimer, par exemple en tant qu'inhibiteur de la fibrillation des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂, ainsi que de l'acétylcholinestérase et de la butylcholinestérase¹²⁶. Son mécanisme d'action *in vivo* est donc complexe puisque ce composé vise plusieurs cibles biologiques.

Taniguchi et al¹⁸⁹ ont testé 9 familles de molécules, soit 42 composés, en tant qu'inhibiteurs de l'agrégation de tau induite par l'héparine *in vitro*. Des phénothiazines (bleu de méthylène, azure A, azure B), la « quinacrine mustard », des ployphénols (par exemple myricetine, epicatechine-5-gallate) et des porphyrines (dehydroporphyrine IX ferrique, porphyrine phthalocyanine) inhibent la fibrillation de tau avec de faibles valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du micromolaire (Tabl. 6-). Cependant ces composés ne désassemblent pas les fibres, seule la porphyrine phthalocyanine possède ce potentiel. Ces molécules n'inhibent pas la liaison de la protéine tau aux microtubules et sont également des inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'A β ₄₀. Dans ces travaux, l'anthracycline daunorubicine n'inhibe pas la fibrillation de tau contrairement à ce qui a été établi par l'équipe de Mandelkow²¹¹. Les auteurs supposent que cette différence est due aux conditions expérimentales utilisées, l'équipe de Mandelkow utilisant une température plus élevée et un fort milieu réducteur pour la fibrillation de la protéine tau.

Narlawar et al¹⁹⁵ ont montré que le curcumin n'inhibe pas la fibrillation de la protéine tau. La modification de la fonction céto-énolique par formation d'un cycle pyrazole permet d'obtenir des composés inhibant la fibrillation de la protéine avec des IC₅₀ et DC₅₀ de l'ordre du micromolaire, et possédant une faible activité d'inhibition de la fibrillation du peptide A β ₄₂ avec des IC₅₀ supérieures à 1 μ M (voir paragraphe II.1.2.1.B). Le composé présenté dans le tableau ci-dessus est un des plus actifs avec une IC₅₀ de 1,2 μ M et une DC₅₀ de 1,1 μ M (Tabl. 6-).

B. Colorants Cyanines

Chirita et al²¹² ont caractérisé le composé N744, appartenant à la classe des benzothiazoles, comme inhibiteur de la fibrillation de la protéine tau *in vitro* (Tabl. 6-). Ce composé possède une activité inférieure au micromolaire avec une IC₅₀ de 0,3 μ M. N744

211. Pickhardt, M.; Gazova, Z.; von Bergen, M.; Khlistunova, I.; Wang, Y.; Hascher, A.; Mandelkow, E.-M.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer's Paired Helical Filaments in Vitro and in Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (5), 3628-3635.

212. Chirita, C.; Necula, M.; Kuret, J., Ligand-Dependent Inhibition and Reversal of Tau Filament Formation†. *Biochemistry* **2004**, *43* (10), 2879-2887.

est un colorant aromatique hautement conjugué, de structure plane et chargé positivement à pH neutre (caractéristiques similaires à celles des phénothiazines décrites ci-dessus). Les interactions hydrophobes observées sont assurées par les hétérocycles benzothiazoles. Cette propriété pourrait expliquer la forte activité inhibitrice du composé N744 par rapport à la thioflavine T et la thioflavine S connus pour marquer les dépôts amyloïdes sans interférer avec leur assemblage²¹³. Enfin, la délocalisation de la charge positive de N744 pourrait contribuer à la planéité de la structure et cette charge serait impliquée dans des interactions électrostatiques. N744 peut également désassembler les fibres préformées de tau pour des concentrations inférieures au micromolaire. Ce composé n'inhibe pas l'agrégation de l' α -synucléine et du peptide A β dans les conditions utilisées. Necula et al²¹³ ont ensuite démontré qu'en présence de cet inhibiteur le temps de latence lors de l'agrégation de tau n'est pas modifié. Ceci impliquerait que ce composé agit sur l'élongation des filaments à leurs extrémités et pas sur la nucléation. De plus, les auteurs ont montré que N744 est un ligand compétitif de la thioflavine S ce qui impliquerait que les deux composés possèdent le même site de liaison. Par la suite les travaux de Congdon et al²¹⁴ ont porté sur le mécanisme d'action de ce composé. A forte concentration, N744 n'inhibe plus l'agrégation de tau. Cela est attribué à la formation d'agrégats par le composé pour des concentrations supérieures à 10 μ M. En présence de la protéine tau, les formes monomériques et dimériques de N744 sont prédominantes dans la gamme de concentration inhibitrice alors qu'au-delà les agrégats sont majoritaires. Honson et al²¹⁵ ont alors imaginé un composé bis-thiacarbocyanine permettant de mimer la forme dimérique de N744 (Tabl. 6-). Ce composé possède une activité quatre fois supérieure à N744 avec une IC₅₀ d'environ 80 nM et comme pour N744 une perte d'activité par formation d'agrégats est observée pour des concentrations supérieures à 1 μ M.

C. Quinoxalines

Crowe et al²¹⁶ ont identifiés deux dérivés de quinoxalines suite au criblage d'une banque d'environ 51 000 molécules sur la fibrillation du mutant de tau K18. Les auteurs ont ainsi sélectionné onze composés appartenant à huit classes de composés dont cinq avaient déjà été publiées. Le test de fibrillation a été réitéré avec ses molécules en

213.Necula, M.; Chirita, C. N.; Kuret, J., Cyanine Dye N744 Inhibits Tau Fibrillization by Blocking Filament Extension: Implications for the Treatment of Tauopathic Neurodegenerative Diseases†. *Biochemistry* **2005**, 44 (30), 10227-10237.

214.Congdon, E. E.; Necula, M.; Blackstone, R. D.; Kuret, J., Potency of a tau fibrillization inhibitor is influenced by its aggregation state. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 465 (1), 127-135.

215.Honson, N. S.; Jensen, J. R.; Darby, M. V.; Kuret, J., Potent inhibition of tau fibrillization with a multivalent ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 363 (1), 229-234.

216.Crowe, A.; Ballatore, C.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y., High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 358 (1), 1-6.

absence de DTT. Plusieurs composés se sont avérés être de faux positifs dont l'anthraquinone et la porphyrine. Les auteurs ont alors testé des composés décrits dans la littérature tels que la daunorubicine, la doxorubicine, l'hémine et la protoporphyrine IX. Ces derniers ne sont pas sensibles à la présence de DTT. Ceci démontre que l'interaction de chaque composé avec le DTT doit être testé. Ainsi deux structures étant des dérivés de quinoxalines se dégagent de ce criblage, inhibant la fibrillation de K18 avec des IC₅₀ autour de 3 µM (Tabl. 6-).

D. Aminothiénopyridazines

Crowe et al²¹⁷ ont récemment découvert une autre classe de molécules hétérocycliques par criblage d'une banque de molécules : les aminothiénopyridazines (ATPZ) dont la structure générale est présentée ci-dessous (Fig. 44).

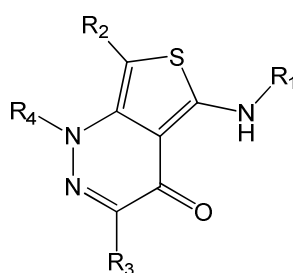


Fig. 44. Structure générale des ATPZ

Suite à un premier criblage réalisé avec un mutant K18 (évaluation de l'activité par polarisation de fluorescence et ThT) sept composés sont sélectionnés dont deux ATPZ qui n'avaient pas été identifiées lors de criblages réalisés par d'autres équipes. Une librairie de ces dérivés a été synthétisée en faisant varier les différents substituants. Une relation structure activité a pu être établie : une substitution en R1 et R2 diminue fortement l'activité, la nature du groupe introduit en R3 influence l'activité (par exemple les groupes phényles substitués en *para* donnent de bons inhibiteurs alors que l'introduction de phényles substitués en *méta*, *ortho* ou disubstitués diminuent l'activité) et les modifications en R4 sont généralement bien tolérées. Les ATPZ ont également peu d'effet sur la polymérisation des microtubules. Elles possèdent un faible pouvoir inhibiteur de la fibrillogénèse de l'Aβ₄₂ et présenteraient donc une sélectivité pour la protéine tau. Elles ne s'agrégent pas et ne sont pas des agents oxydants. Chez la souris, ces composés ont

217.Crowe, A.; Huang, W.; Ballatore, C.; Johnson, R. L.; Hogan, A.-M. L.; Huang, R.; Wichterle, J.; McCoy, J.; Huryn, D.; Auld, D. S.; Smith, A. B.; Inglese, J.; Trojanowski, J. Q.; Austin, C. P.; Brunden, K. R.; Lee, V. M. Y., Identification of Aminothenopyridazine Inhibitors of Tau Assembly by Quantitative High-Throughput Screening. *Biochemistry* **2009**, 48 (32), 7732-7745.

une bonne biodisponibilité et passent la BHE^{218,219}. Les composés **A** et **B** présentés dans le tableau ci-dessus (Tabl. 6-) sont deux exemples des meilleurs inhibiteurs ATPZ trouvés avec des IC₅₀ respectives de 2,5 µM²¹⁷ et 8 µM²¹⁹ ainsi que des pourcentages d'inhibition respectifs de 94% et 83%. Le composé **A** inhibe seulement 1% de la fibrillation du peptide Aβ₄₂²¹⁷. Le composé **B** est le composé le plus prometteur testé chez la souris car il présente la dose maximale tolérée par l'animal pendant un mois et est bien toléré avec aucun effet secondaire noté pour une dose injectée de 50 mg/kg²¹⁹.

E. Rhodanines

Mandelkow et col.^{72,220} ont criblé une banque de molécules hétérocycliques afin de sélectionner des composés capables d'inhiber la fibrillation de la protéine tau. Les premiers tests de criblage ont été réalisés avec les mutant K18 ou K19. D'autres tests *in vitro* ont été effectués pour affiner la sélection des inhibiteurs suite à ce premier criblage. Les auteurs ont ainsi trouvé plusieurs classes de composés capables d'inhiber l'agrégation de la protéine tau : les rhodanines, les phénylthiazolylhydrazides, les N-phénylaminés, les phénouthiazines et les anthraquinones (Tabl. 6-). Par la suite, les familles de composés ont été étudiées séparément.

La classe des rhodanines fait partie des inhibiteurs de tau les plus prometteurs. La structure générale des rhodanines est présentée ci-dessous (Fig. 45)^{72,221}.

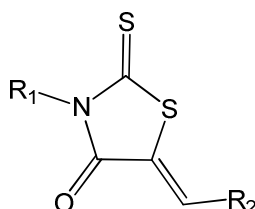


Fig. 45. Structure générale des rhodanines

Une relation structure activité a pu être établie. La présence des deux atomes de souffres du noyau rhodanine est essentielle pour avoir une bonne inhibition de la

218. Ballatore, C.; Brunden, K. R.; Piscitelli, F.; James, M. J.; Crowe, A.; Yao, Y.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Smith, A. B., Discovery of Brain-Penetrant, Orally Bioavailable Aminothienopyridazine Inhibitors of Tau Aggregation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (9), 3739-3747.

219. Ballatore, C.; Crowe, A.; Piscitelli, F.; James, M.; Lou, K.; Rossidivito, G.; Yao, Y.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Brunden, K. R.; Smith, A. B., Aminothienopyridazine inhibitors of tau aggregation: Evaluation of structure-activity relationship leads to selection of candidates with desirable in vivo properties. *Biorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (14), 4451-4461.

220. Gregor, L.; Marcus, P.; David, G. L.; Boris, S.; Eckhard, M., Screening for Inhibitors of Tau Protein Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments: A Ligand Based Approach Results in Successful Scaffold Hopping. *Curr Alzheimer Res* **2007**, *4* (3), 315-323.

221. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Khlistunova, I.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Waldmann, H., Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Angew. Chem.* **2007**, *119* (48), 9375-9379.

formation des fibres et pouvoir les désassembler. Un acide carboxylique en R1 conduit à une bonne activité des composés mais son estérification ou son remplacement par un groupe benzimidazole ou imidazole diminue le potentiel des composés à désagréger les fibres. Un lien supérieur à deux carbones entre l'acide carboxylique en R1 et le cœur rhodanine entraîne également une diminution du potentiel de désagrégation des fibres. Cependant la diminution du potentiel à désassembler les fibres n'est pas concomitante à celle du potentiel d'inhibition de la formation des fibres. Ceci suggère que ces deux processus pourraient se faire sur deux sites de liaisons différents. Enfin, une chaîne aromatique en R2 semble essentielle pour les interactions de π -stacking. Le composé représenté dans le tableau Tabl. 6- est un des composés les plus prometteurs identifiés dans cette librairie de rhodanines. Il permet d'inhiber la formation des fibres ($IC_{50}=0,67 \mu M$) mais également de les désagréger ($DC_{50}=0,94 \mu M$). Il entraîne 70% d'inhibition de la formation de fibres dans les tests cellulaires et possède une faible cytotoxicité. En effet, bien que d'autres composés aient de meilleures IC_{50} , leur cytotoxicité et leur manque d'inhibition dans les cellules sont en leur défaveur. Ceci peut être attribué à l'acide carboxylique présent en R1 pour ces composés qui en apportant une charge négative diminue leur pénétration cellulaire. L'introduction d'un groupe benzimidazole en R1 (Tabl. 6-) pourrait expliquer la meilleure activité dans les cellules de cette rhodanine.

F. Phénylthiazolylhydrazides

La structure générale de la classe des phénylthiazolylhydrazides (PTH) est présentée ci-dessous (Fig. 46)²²².

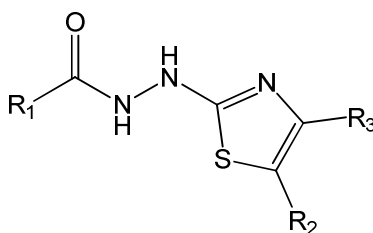


Fig. 46. Structure des phénylthiazolylhydrazides

Ces composés permettent d'inhiber la formation de fibres de tau dans les tests de fibrillation *in vitro* mais aussi dans les cellules. Bien que ces composés soient moins efficaces que les rhodanines dans les tests de cinétique d'agrégation, ils possèdent une meilleure pénétration cellulaire. Les composés les plus actifs possèdent des cycles aromatiques en R1 et R3, tandis que R2 est le plus souvent un atome d'hydrogène. Après modification du chef de file obtenu suite à un premier criblage, le composé présenté dans

222. Pickhardt, M.; Larbig, G.; Khlistunova, I.; Coksezen, A.; Meyer, B.; Mandelkow, E.-M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E., Phenylthiazolyl-Hydrazide and Its Derivatives Are Potent Inhibitors of τ Aggregation and Toxicity in Vitro and in Cells†. *Biochemistry* **2007**, 46 (35), 10016-10023.

le tableau Tabl. 6- semble le plus prometteur. Il possède une IC₅₀ de 1,6 µM, une DC₅₀ de 0,7 µM, inhibe 82% de la formation des fibres de tau dans les cellules et est peu cytotoxique. Une étude RMN a montré que l'affinité pour la cible est due à un grand nombre d'interactions hydrophobes. Le cycle imidazole pourrait être protoné à pH 7,2 et être impliqué dans des interactions polaires.

G. N-phénylamines et anthraquinones

Afin d'étudier les différents composés issus du criblage de leur banque de molécules, Mandelkow et col.^{211,223,224} ont développé un modèle cellulaire permettant d'étudier la toxicité de tau sous sa forme soluble et agrégée, l'apparence des agrégats de tau après induction et leur dissolution éventuelle après extinction du gène. Ce modèle a permis d'étudier l'effet de petites molécules sur la formation des agrégats de tau et leur dissolution. Les auteurs ont exprimé le mutant K18ΔK280 qui peut former des fibres sans addition d'héparine. Des agrégats positifs à la ThS et possédant une morphologie similaire à ceux développés lors de la maladie d'Alzheimer se forment à partir du cinquième jour après induction du gène. La formation des agrégats corrèle avec l'augmentation de la toxicité cellulaire. L'expression d'un mutant de tau ne formant pas d'agrégats (introduction de prolines dans la séquence) ne provoque pas de toxicité cellulaire. L'arrêt de l'induction du gène du mutant K18ΔK280 entraîne la dissolution des agrégats ce qui présume un processus réversible contrairement à ce qui a pu être observé pour la maladie d'Alzheimer. Le modèle cellulaire a permis de tester deux familles de molécules : les N-phénylamines et les anthraquinones (Tabl. 6-).

Le pouvoir inhibiteur sur l'agrégation de tau de cinq anthraquinones a été évalué *via* ce modèle cellulaire. Ces composés permettent d'inhiber l'agrégation de K19 avec des IC₅₀ entre 1 et 5 µM. Ils permettent aussi de dissoudre des agrégats préformés avec des DC₅₀ entre 2 et 4 µM. Les composés n'interagissent pas avec l'héparine et n'interfèrent pas avec la stabilisation des microtubules.

Les N-phénylamines inhibent la fibrillation de tau *in vitro* avec une IC₅₀ d'environ 10 µM et permettent également la dissolution de fibres préformées avec une DC₅₀ entre 5 et 10 µM²²³. Dans les cellules, l'introduction de ces composés à une concentration de 10 µM permet de réduire jusqu'à 70% la formation d'agrégats de tau. Cette diminution est reliée à une baisse de la cytotoxicité.

223.Khlistunova, I.; Biernat, J.; Wang, Y.; Pickhardt, M.; von Bergen, M.; Gazova, Z.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.-M., Inducible Expression of Tau Repeat Domain in Cell Models of Tauopathy: Aggregation is toxic to cells but be reversed by inhibitors drugs *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (2), 1205-1214.

224.Pickhardt, M.; Biernat, J.; Khlistunova, I.; Wang, Y. P.; Gazova, Z.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., N-Phenylamine Derivatives as Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Curr Alzheimer Res* **2007**, *4* (4), 397-402.

La toxicité cellulaire des composés eux-mêmes a été évaluée. Les N-phénylaminés sont 40% moins toxiques que les anthraquinones²²⁴. Ces dernières seraient donc plus difficilement utilisables *in vivo*. Cependant, la plupart des N-phénylaminés possèdent une cytotoxicité supérieure à 10% et restent donc plus toxiques que d'autres molécules telles que les rhodanines.

II.1.3. Approches multimériques

La présentation de plusieurs copies d'une molécule biologiquement active sur un châssis moléculaire augmente sa concentration locale. Le premier exemple de composé multivalent pour inhiber la formation de dépôts amyloïdes a été décrit par May et al²²⁵. Dans ces travaux une forme bivalente d'un ligand acridine permet d'inhiber la conversion pathologique du Prion dans un modèle cellulaire avec une activité supérieure à celle observée pour la forme monomérique.

Un autre exemple, cité auparavant, est un dimère de thiocarbocyanine qui possède un pouvoir inhibiteur de la fibrillation de la protéine tau ($IC_{50}=80$ nM) quatre fois supérieur à celui du composé N744 ($IC_{50}=300$ nM)²¹⁵. Le dimère possède deux conformations : ouverte et fermée. La forme fermée et des agrégats sont prédominants en solution alors qu'en présence de la protéine tau la forme ouverte est majoritaire et les agrégats sont fortement diminués. Ceci indique que l'activité du composé est due à l'effet de multivalence et non à son agrégation.

Chafekar et al²²⁶ ont également synthétisé un assemblage comportant quatre peptides KLVFF liés sur un dendrimère par ligation native (composé K_4). Pour un ratio 1:4 ($A\beta_{42}$ /inhibiteur), K_4 inhibe 90% de la fibrillation de l' $A\beta_{42}$ tandis que son homologue monomérique K_1 inhibe 25% de la formation des fibres. De plus K_4 désassemble 65% des fibres d' $A\beta_{42}$ préformées pour un ratio 1:16 ($A\beta_{42}/K_4$) alors que pour ce même ratio K_1 désassemble seulement 25% des fibres. Ces travaux montrent que la présentation de plusieurs copies d'un peptide briseur de feuillet β sur un châssis moléculaire permet d'obtenir un inhibiteur de plus fort potentiel que son homologue monomérique.

Cette approche a en particulier été utilisée ultérieurement au laboratoire pour concevoir à partir d'un châssis cyclodécapeptidique des inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide $A\beta_{40}^{130-133}$. Deux ou quatre exemplaires de molécules hétéroaromatiques ou

225. May, B. C.; Fafarman, A. T.; Hong, S. B.; Rogers, M.; Deady, L. W.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E., Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (6), 3416-3421.

226. Chafekar, S. M.; Malda, H.; Merckx, M.; Meijer, E. W.; Viertl, D.; Lashuel, H. A.; Baas, F.; Scheper, W., Branched KLVFF Tetramers Strongly Potentiate Inhibition of β -Amyloid Aggregation. *ChemBioChem* **2007**, *8* (15), 1857-1864.

peptidiques ont été greffés sur une face du châssis, l'autre face présentant des arginines pour augmenter la solubilité des assemblages. Les structures des composés synthétisés sont présentées en Fig. 47.

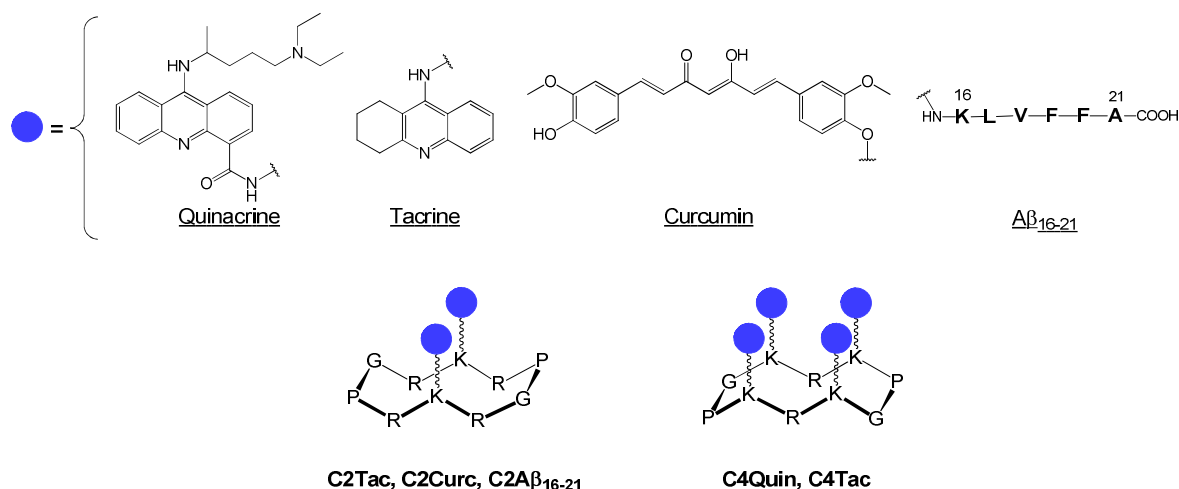


Fig. 47. Inhibiteurs multimériques de la fibrillogénèse de l'Aβ₄₀ basés sur le châssis cyclodécapeptide¹³⁰

Le premier assemblage présente quatre dérivés de la quinacrine (C4Quin avec C=cyclodécapeptide), qui est connue pour inhiber la conversion de la protéine du Prion *in vitro*¹³¹. Les assemblages suivants portent deux (C2Tac) et quatre (C4Tac) dérivés de la tacrine, connue comme inhibiteur de l'acétylcholinestérase¹³³. La dernière molécule hétéroaromatique choisie est le curcumin, inhibiteur de la fibrillation du peptide Aβ₄₀, qui a été lié en deux exemplaires sur le cyclodécapeptide (C2Curc)¹³². Enfin, le dernier assemblage présente deux hexapeptides KLVFFA ou Aβ₁₆₋₂₁ (C2Aβ₁₆₋₂₁) capables de se lier au peptide Aβ₄₀ et d'inhiber la formation des fibres à haute concentration¹³². Les assemblages présentant une seule copie de quinacrine et de tacrine (C1Quin, C1Tac) ont également été synthétisés afin de vérifier que l'activité des assemblages est due à la multimérie. Les châssis seuls (C2K avec K=lysine, C4K) ont été testés et présentent un faible pouvoir inhibiteur sur la formation des fibres. Les résultats des évaluations biologiques effectuées *in vitro* sont résumés dans le tableau Tabl. 7- . Le pouvoir inhibiteur des composés sur la formation des fibres d'Aβ₄₀ a été évalué ainsi que leur capacité à interférer sur l'élongation de ces fibres. Pour cette dernière expérience, des amorces de fibres préformées sont mises en présence de monomères (suppression de la phase de latence). Enfin, les assemblages de la tacrine ont été testés en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'acétylcholinestérase.

Tabl. 7- Activités inhibitrices des assemblages basés sur le cyclodécapeptide

(N.d. = non déterminée)

Composés	Inhibition de la formation des fibres (IC ₅₀)	Inhibition de l'élongation des fibres (IC ₅₀)	Inhibition de l'acétylcholinestérase (IC ₅₀)
Quin	> 100 µM	Non	
C1Quin	> 100 µM	Non	
C4Quin	≈20 µM	2 µM	
Tac	>100 µM	Non	58 nM
C1Tac	> 100 µM	Non	185 nM
C2Tac	20 < IC ₅₀ < 100 µM	Non	57 nM
C4Tac	< 1µM	Non (ralentit à 100 µM)	42 nM
Curc	≈10 µM	≈10 µM	
C2Curc	1 < IC ₅₀ < 4 µM	≈1 µM	
Aβ ₁₆₋₂₁	> 100 µM	N.d.	
C2Aβ ₁₆₋₂₁	0,04 < IC ₅₀ < 0,1 µM	0,1 < IC ₅₀ < 1 µM	

Tous les composés multimériques (à deux ou quatre biomolécules) sont de bons inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide Aβ₄₀ contrairement à leurs homologues monomériques. En particulier la présentation de quatre dérivés de la tacrine (C4Tac) permet d'augmenter le pouvoir inhibiteur d'un facteur dix environ par rapport au composé C2Tac. Les composés C4Quin, C2Curc permettent également d'inhiber l'élongation des fibres. Le composé C4Tac permet seulement de ralentir l'élongation à une concentration de 100 µM mais n'empêche pas leur formation. Ceci n'est pas observé pour le composé C2Tac. Enfin, les composés de la tacrine sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase avec une activité inhibitrice équivalente à celle de la tacrine excepté pour le composé C1Tac qui possède un pouvoir inhibiteur plus faible. Ceci démontre que deux dérivés au minimum sont nécessaires pour obtenir une activité similaire à celle de la tacrine. Ces travaux démontrent l'intérêt de la présentation multimérique pour développer des inhibiteurs de la fibrillogénèse possédant une meilleure activité que leurs homologues monomériques.

II.2. Synthèse des inhibiteurs de la fibrillogénèse du peptide Aβ et de la protéine tau

La conception de nos inhibiteurs de la fibrillogénèse de tau et d'Aβ repose sur la présentation multimérique de molécules capables d'interférer avec les fibres sur un châssis moléculaire dicétopiperazine. Les molécules ciblant l'agrégation de la protéine tau et/ou du peptide Aβ₄₀ sont des composés hétéroaromatiques et peptidiques. Une telle

approche multimérique mais à partir d'un châssis cyclodécapeptidique a été utilisée ultérieurement au laboratoire pour la conception d'inhibiteurs de la fibrillogénèse de l'A β ₄₀. Cependant le cyclodécapeptide du fait de son haut poids moléculaire ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ainsi, nous nous sommes orientés vers un châssis moléculaire de plus petite taille basé sur le motif 2,5-dicétopiperazine (DCP)¹⁴⁵, l'équipe de Teixidó et al¹⁴⁴ ayant montré le potentiel *in vitro* de ce châssis comme transporteur pour passer la BHE.

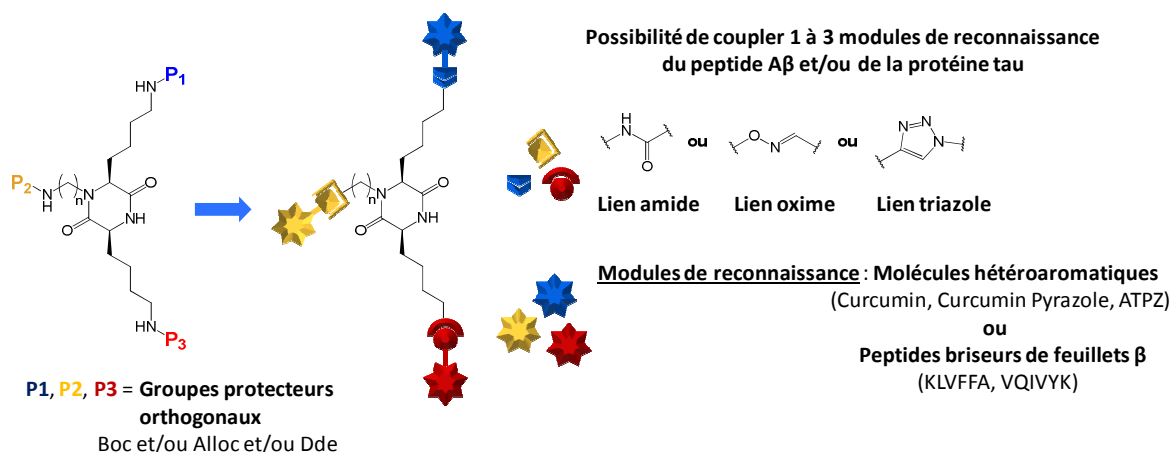


Fig. 48. Synthèse d'inhibiteurs à partir du châssis moléculaire dicétopiperazine (DCP)

Le motif dicétopiperazine que nous avons retenu pour nos travaux résulte de la condensation de deux lysines (Fig. 48). Les chaînes latérales des deux lysines sont deux points d'ancrage pour l'introduction des peptides ou hétérocycles d'intérêt. Un troisième site de liaison a été introduit sur un azote du cycle par addition d'une chaîne aminoalkyle dont le nombre de carbones peut varier. Ce cycle dicétopiperazine possède deux faces distinctes de part la stéréochimie des lysines dont les chaînes latérales sont dirigées d'un même côté du cycle. En revanche la chaîne aminoalkyle se trouve dans le plan du cycle. Nos composés ciblant la fibrillogénèse possèdent une chaîne aminoalkyle à six carbones, cette longueur de chaîne permettant d'avoir un bras flexible et de limiter l'encombrement stérique pour l'adressage sur la fonction amine. Une chaîne aminoalkyle à trois carbones a également été introduite sur le châssis composé de deux lysines ainsi que sur un châssis correspondant à la condensation d'une lysine et d'une glycine (DCP présentant deux sites d'ancrages). Ces composés ont été utilisés pour synthétiser des marqueurs des fibres (cf paragraphe II.3).

L'utilisation de groupes protecteurs orthogonaux permet un adressage sélectif des trois amines. Une à trois molécules de natures variées (hétéroaromatiques ou peptidiques) peuvent ainsi être liées sur les fonctions amines de la DCP en utilisant diverses réactions de couplage (Fig. 48). La fonction amine située dans le plan du cycle

DCP pourrait également permettre l'introduction d'un élément de détection (fluorophore, radiomarquage) ou un élément permettant la modulation des propriétés pharmacocinétiques. La déprotection sélective des fonctions amines permet de coupler des molécules par lien amide *via* des fonctions acides. Les amines libérées peuvent aussi être fonctionnalisées pour ensuite être engagées dans des réactions chimiosélectives. Nous avons choisi ici d'utiliser deux réactions chimiosélectives : le lien éther d'oxime et le lien triazole. Le lien éther d'oxime correspond à la condensation d'une fonction carbonyle avec une fonction oxyamine. Cette réaction a été utilisée pour coupler des peptides sur le châssis dicétopiperazine, chaque partenaire (DCP et peptides) ayant été fonctionnalisé préalablement par les groupes nécessaires. Le lien 1,4-triazole est formé par cycloaddition-1,3-dipolaire d'une fonction azoture avec une fonction alcyne en présence de cuivre I pour catalysée la réaction et obtenir régiosélectivement l'isomère 1,4-triazole. De nouveau les deux partenaires doivent être fonctionnalisés avec les fonctions réactives correspondantes.

Les premiers composés réalisés résultent du couplage des fonctions acides C-terminales de peptides avec les fonctions amines des châssis dicétopiperazines par lien amide. La séquence peptidique choisie est le fragment A β ₁₆₋₂₁ du cœur hydrophobe du peptide A β . Dans le paragraphe II.1.1 nous avons vu que ce peptide de six acides aminés est un inhibiteur de la fibrillogénèse avec de forts ratios molaires A β /peptide mais que cette activité peut être améliorée en présentant deux exemplaires de cette séquence sur un châssis.

Des assemblages présentant des peptides briseurs de feuillets introduits par leurs extrémités N-terminales sur le châssis DCP *via* un lien éther d'oxime ont également été synthétisés. Les séquences peptidiques sélectionnées sont les séquences KLVFFA (A β ₁₆₋₂₁) et la séquence VQIVYK (tau₃₀₆₋₃₁₁). Nous avons choisi d'introduire les fonctions oxyamines sur le châssis DCP et les fonctions aldéhyde aux extrémités N-terminales des séquences peptidiques.

Enfin, des composés hétéroaromatiques ont été greffés sur le châssis DCP par formation d'un lien triazole. Nous avons fait le choix d'introduire les fonctions azotures sur le châssis DCP tandis que les fonctions alcynes sont portées par des molécules hétérocycliques (Fig. 49). Ces molécules ont été choisies car elles ont été décrites dans la littérature pour interférer efficacement avec la fibrillation du peptide A β et/ou de la protéine tau.

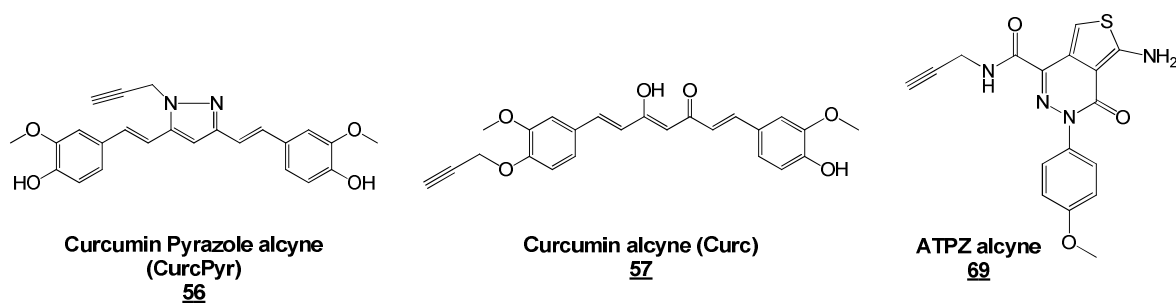


Fig. 49. Composés hétérocycliques alcynes

Dans un premier temps nous décrirons la synthèse des châssis dicétopiperazines dont les fonctions amines sont protégées. Ensuite nous développerons les méthodes de synthèse utilisées pour obtenir des inhibiteurs multimériques de la fibrillation du peptide A β et/ou de la protéine tau. Des assemblages comportant une histidine dans le plan du cycle DCP et un ou deux modules de reconnaissance ont également été synthétisés dans le but de les marquer avec un élément radioactif par la suite. Enfin, nous présenterons l'évaluation biologique de tous ces assemblages.

Par commodité, nous avons choisi de nommer les DCPs synthétisées non seulement par un numéro correspondant aux longueurs des chaînes dans le plan du cycle, mais aussi par acronyme relatif aux substituants présents sur leurs chaînes latérales et sur les azotes des cycles. Par exemple, le composé D6C-Boc/2Alloc possède dans le plan du cycle une chaîne carbonée à six carbones (D6C) avec une fonction amine à son extrémité protégée par un groupement Boc ainsi que deux groupements Alloc sur les chaînes latérales des lysines. Les assemblages présentant des composés hétéroaromatiques et peptidiques seront nommés de la même manière. Par exemple, le composé D6C-AFFVLK/2NH₂ correspond à une DCP possédant une chaîne carbonée à six carbones dans le plan du cycle sur laquelle est lié un motif KLVFFA par son extrémité C-terminale. Les fonctions amines des chaînes latérales des lysines de ce composé sont libres. Le composé D6C-NH₂/2KLVFFA correspond à un châssis DCP avec un azote du cycle alkylé avec une chaîne aminoalkyle à six carbones dont la fonction amine est libre et portant deux peptides KLVFFA liés par leur extrémité N-terminale sur les chaînes latérales des lysines. Le composé D3C-His/VQIVYK possède un cycle DCP (obtenu par condensation d'une lysine et d'une glycine) avec une chaîne aminoalkyle à trois carbones portant une histidine à son extrémité, et présentant un peptide VQIVYK couplé par son extrémité N-terminale sur la chaîne latérale de la lysine.

II.2.1. Synthèse des DCP protégées

II.2.1.1. Stratégie de synthèse envisagée pour notre châssis DCP

La stratégie de synthèse de nos châssis moléculaires DCP est présentée ci-dessous (Fig. 50).

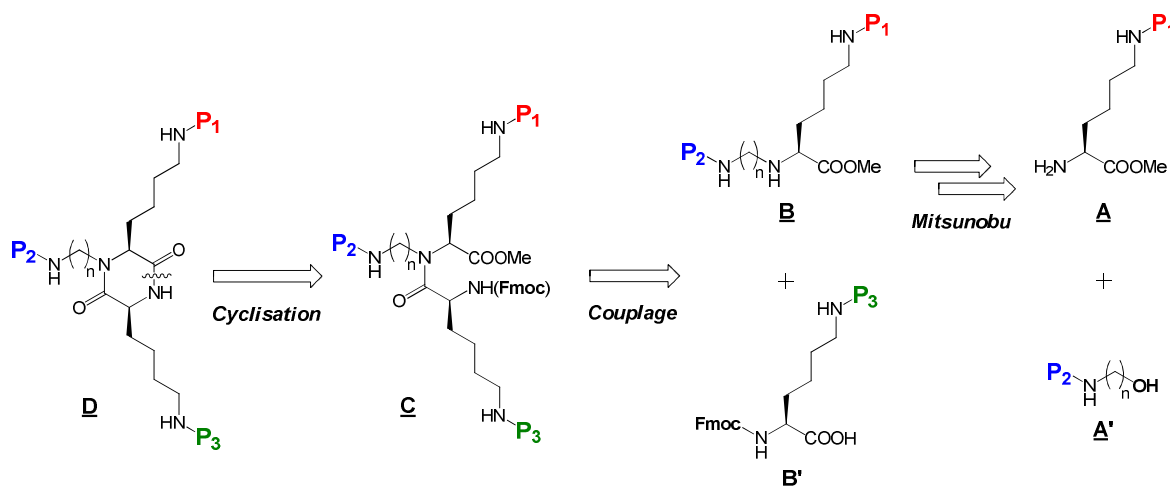


Fig. 50. Rétro-synthèse générale de nos châssis DCP

Dans la littérature, plusieurs stratégies de synthèse des châssis dicétopiperazines sont décrites^{145,147}. La synthèse peut être effectuée en solution ou sur support solide. Les synthèses en solution utilisent, par exemple, des réactions de chimie combinatoire, comme la réaction de Ugi, ou la formation d'une amine secondaire sur laquelle peut être couplé un autre acide aminé par sa fonction acide en alpha¹⁴⁵. Ces méthodes ne permettent pas toujours de contrôler la stéréochimie et ne peuvent pas toujours être reproduites avec des rendements satisfaisants. C'est pourquoi nous avons choisi de développer une stratégie de synthèse modifiée à partir de ce qui a déjà été décrit dans la littérature^{151,227}.

Le premier élément à synthétiser est une lysine **A** dont l'amine ε est protégée et la fonction acide α est protégée sous forme d'ester méthylique (Fig. 50). Le groupe méthyle constitue également un bon groupe partant pour la réaction de cyclisation conduisant au cycle dicétopiperazine lors de la dernière étape de synthèse.

227.(a) Gellerman, G.; Hazan, E.; Bridger, T.; Traube, T.; Albeck, A.; Shatzmiller, S., Facile Synthesis of Orthogonally Protected Optically Pure Keto- and Diketopiperazine Building Blocks for Combinatorial Chemistry. *Int J Pept Res Ther* **2008**, 14 (2), 183-192; (b) Gellerman, G.; Hazan, E.; Kovaliov, M.; Albeck, A.; Shatzmiller, S., Synthesis of orthogonally protected optically pure ketopiperazine, diketopiperazine, ketodiazepane, and 3-aminopyrrolidone building blocks for peptidomimetic combinatorial chemistry. *Tetrahedron* **2009**, 65 (7), 1389-1396.

La réaction de couplage de la lysine **A** ne peut pas se faire directement avec la lysine **B'** car nous souhaitons substituer un seul azote du cycle DCP. Il est au préalable nécessaire de synthétiser une unité lysine **B** portant déjà la chaîne aminoalkyle en N α (Fig. 50). Pour ce faire plusieurs méthodes de synthèse sont envisageables : la substitution nucléophile, l'amination réductrice, la réduction d'un amide ou la réaction de Mitsunobu²²⁸. Trois de celles-ci ont été testées (Fig. 51).

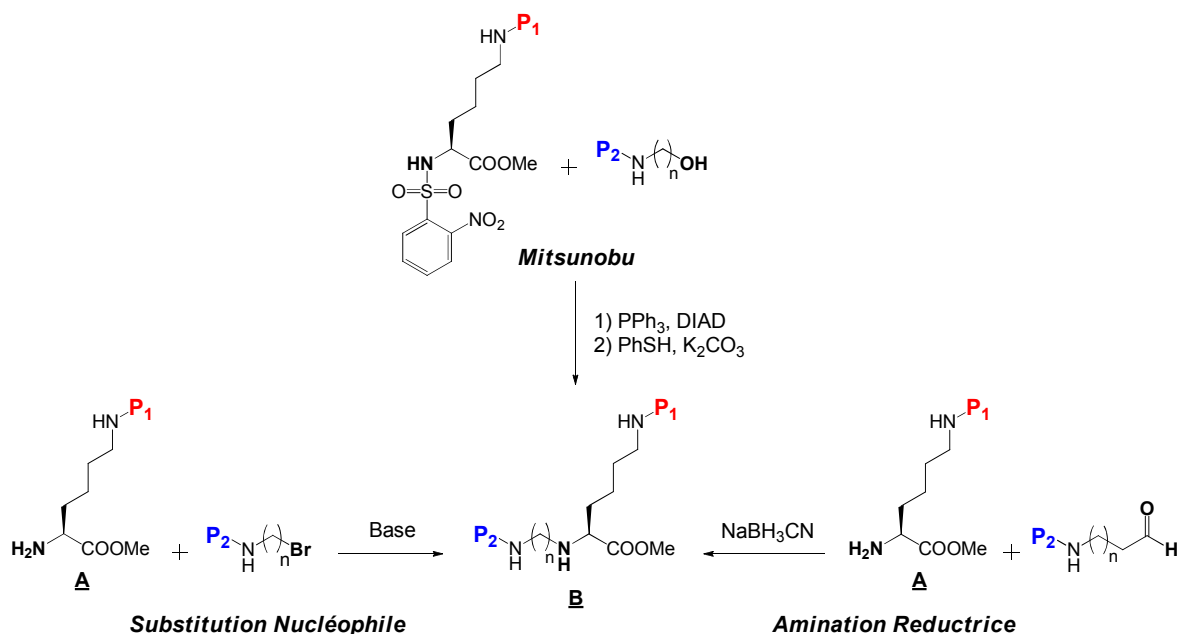


Fig. 51. Synthèses de l'unité lysine **B**

La réaction de Mitsunobu entre une amine activée par un groupe *o*-nitrobenzosulfonyle (ou nosyle) et un alcool conduit exclusivement à l'amine secondaire après coupure du nosyle par réaction du thiophénol en milieu basique^{228,229,230}. Le groupe nosyle permet de rendre le proton de l'amine plus acide afin qu'il soit déprotonné plus facilement par le DIAD lors de la réaction de Mitsunobu. Cette méthode de synthèse a été retenue car les premiers essais permettaient d'obtenir la lysine **B** souhaitée avec un excellent rendement ($P_1=P_3=Alloc$ et $P_2=Boc$, 50% de rendement pour 7 étapes de synthèse). Les aminoalcools nécessaires pour cette synthèse sont disponibles dans le commerce. De plus, le groupe nosyle est introduit facilement avec de bons rendements sur les amines α des lysines de départ. Les deux autres stratégies de synthèse ont également été testées. Cependant, la substitution nucléophile conduit aux amines

228.Kan, T.; Fukuyama, T., New strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun.* **2003**, (4), 353-359.

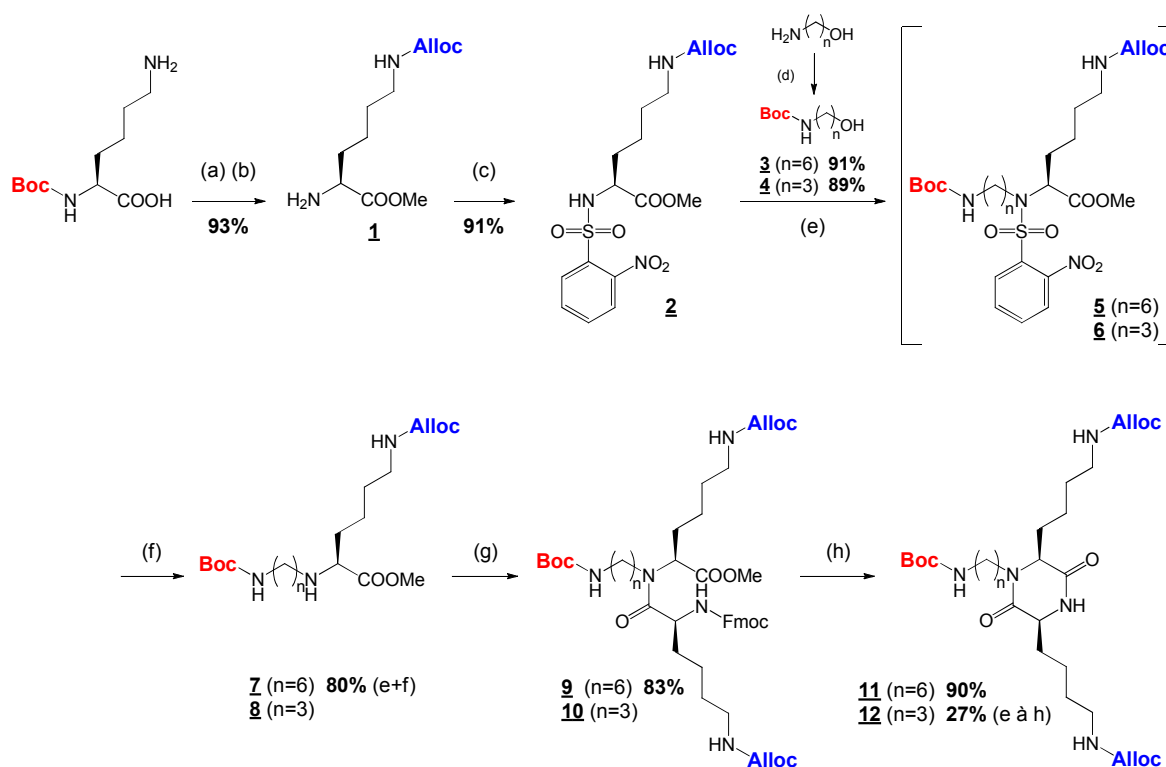
229.Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C.-K.; Hidai, Y.; Kan, T., 2, 4-Dinitrobenzenesulfonamides: A simple and practical method for the preparation of a variety of secondary amines and diamines. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (33), 5831-5834.

230.Demmer, O.; Dijkgraaf, I.; Schottelius, M.; Wester, H.-J.; Kessler, H., Introduction of functional groups into peptides via N-alkylation. *Org. Lett.* **2008**, 10 (10), 2015-2018.

primaire et secondaire, nécessite souvent des bases fortes et les résultats sont peu reproductibles. Nous avons tenté également d'activer l'amine **A** par un groupe nosyle²²⁸ afin de rendre le proton plus acide et d'empêcher la dialkylation mais les rendements obtenus n'étaient pas satisfaisants (résultats non présentés). La réaction d'amination réductrice a également été testée²²⁷. Bien que la lysine **B** ait pu être obtenue avec des rendements satisfaisants (50-70%), la réaction de couplage avec la lysine **B'** ne fonctionnait pas (résultats non décrits) ce qui pourrait être attribué à un amalgame avec le bore formé lors de la réduction de l'imine.

En effet, après avoir synthétisé la lysine **B**, le couplage de la lysine **B'** est réalisé sur son amine secondaire. Le dipeptide **C** est obtenu et l'étape suivante consiste à former le cycle DCP **D**. Pour cela le groupement Fmoc est coupé en milieu basique et la fonction amine libérée réagit sur l'ester méthylique pour former un amide. L'introduction de la chaîne aminoalkyle sur la lysine **A** au début de la synthèse permet d'apporter une contrainte géométrique facilitant cette étape.

II.2.1.2. Synthèse des D6C-Boc/2Alloc **11** et D3C-Boc/2Alloc **12**



Réactifs : (a) Alloc-Cl, Et₃N, H₂O/dioxane (1:1) (b) TMSCl, MeOH (c) o-NsCl, Et₃N, H₂O/dioxane (1:1) (d) Boc₂O, MeOH (e) **3** ou **4**, PPh₃, DIAD, THF (f) PhSH, K₂CO₃, DMF (g) Fmoc-Lys(Alloc)-OH, HATU, DIEA, DCM (h) pipéridine/DCM (2:8)

Fig. 52. Synthèse des D6C-Boc/2Alloc **11 et D3C-Boc/2Alloc **12****

La lysine **1** est obtenue en protégeant dans un premier temps la fonction amine ϵ par un groupement Alloc par ajout d'allylchloroformate sur la Boc-Lys-OH (Fig. 52). Dans un second temps, le groupement Boc est coupé simultanément à la méthylation de la fonction acide α par action du TMSCl dans le MeOH afin d'aboutir à la lysine **1** avec un rendement global de 93% pour les deux étapes. Un groupe nosyle est alors facilement introduit par substitution nucléophile de l'amine α sur le chlorure de nitrobenzosulfonyle pour donner le composé **2** avec un bon rendement de 91%.

Les alcools **3** et **4** ont été synthétisés préalablement, avec des rendements respectifs de 91% et 89%, par réaction du (Boc)₂O avec les fonctions amines du 6-aminohexan-1-ol et du 3-aminohexan-1-ol. L'étape suivante est la réaction de Mitsunobu entre l'alcool aliphatique à six (**3**) ou trois carbones (**4**) et la lysine **2**. La purification sur gel de silice ne permet pas d'isoler les produits **5** et **6** et un mélange (alcool **3** ou **4**, lysine **2** et produit **5** ou **6**) est obtenu. Lorsque la réaction de Mitsunobu est réalisée avec l'alcool **4**, elle n'est pas totale et difficile à suivre par CCM ainsi que par CLHP. De plus, le PPh₃O n'est pas totalement éliminé après purification sur gel de silice. Ce sous-produit sera éliminé seulement lors de la dernière étape de cyclisation. Il est donc difficile de calculer des rendements pour chaque étape de cette synthèse et les produits bruts ont été utilisés pour les étapes de synthèse suivantes, le PPh₃O n'interférant pas avec ces réactions.

Les amines secondaires des lysines **7** et **8** sont libérées suite à la coupure du nosyle en présence de thiophénol et de K₂CO₃. L'alcool **3** et la lysine **1** sont facilement éliminés lors de la purification sur gel de silice et le produit **7** est obtenu avec un bon rendement de 80% sur deux étapes de synthèse. En revanche, la lysine **8** est obtenue sous forme de mélange avec du PPh₃O résiduel suite à la purification sur gel de silice. Ce produit est utilisé sans étape de purification supplémentaire.

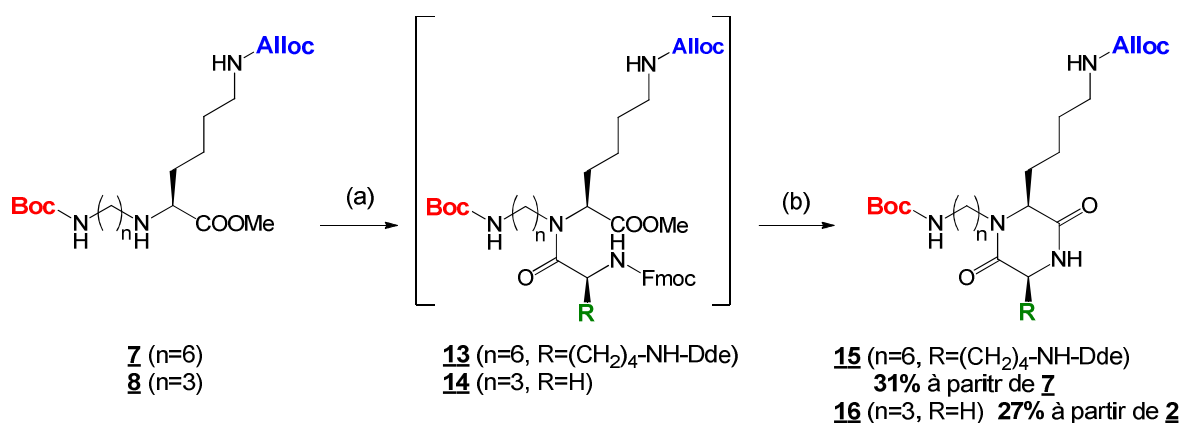
La Fmoc-Lys(Alloc)-OH est ensuite couplée sur les amines secondaires des composés **7** et **8** en présence d'HATU pour obtenir les dipeptides **9** et **10**. Pour cette étape, les agents de couplage ordinaires tel que le PyBOP ne sont pas efficaces. Plusieurs agents de couplage ont donc été testés dans le DCM et le DMF : PyAOP, PyBrOP, HATU et TFFH. Le meilleur rendement est obtenu en utilisant HATU dans le DCM. Le produit **9** est isolé après purification sur gel de silice avec un rendement satisfaisant de 83%. Le dipeptide **10** est quant à lui obtenu sous forme de mélange avec le PPh₃O. Ce produit brut est utilisé pour l'étape de synthèse suivante.

La dernière étape de synthèse consiste à couper le groupement Fmoc en présence de pipéridine (20% dans le DCM) ce qui entraîne spontanément la cyclisation par création d'un lien amide entre la fonction amine libérée et l'ester méthylique. La dicétopiperazine

11 (D6C-Boc/2Alloc) est obtenue avec un rendement de 90% après purification sur gel de silice. La D6C-Boc/2Alloc **11** est ainsi synthétisée avec un rendement de 50% à partir de la lysine **1** (7 étapes de synthèse). De la même manière la D3C-Boc/2Alloc **12** est isolée après purification sur colonne sur gel de silice avec un rendement de 27% sur quatre étapes de synthèse (à partir de **2**). Le rendement global est de 22% à partir de la lysine **1** ce qui reste satisfaisant.

II.2.1.3. Variation de l'acide aminé couplé sur la lysine N α alkylée

Dans le schéma de synthèse précédent, la Fmoc-Lys(Alloc)-OH est couplée sur les lysines **7** et **8**. A partir de ces intermédiaires, d'autres acides aminés (Fmoc-Acide Aminé-OH) peuvent être couplés afin de diversifier les possibilités de fonctionnalisation du châssis. Deux exemples sont présentés dans la Fig. 53.



Réactifs : (a) Fmoc-Lys(Dde)-OH ou Fmoc-Gly-OH, HATU, DIEA, DCM (b) pipéridine/DCM (2:8)

Fig. 53. Schéma de synthèse des D6C-Boc/Alloc/Dde **15 et D3C-Boc/2Alloc **16****

La Fmoc-Lys(Dde)-OH a été couplée avec l'amine secondaire du composé **7**. La réaction de couplage n'est pas totale. Le dipeptide **13** est ainsi obtenu sous forme de mélange avec la lysine **7** après purification sur gel de silice. Après coupure du groupement, la D6C-Boc/Alloc/Dde **15** est isolée après purification sur gel de silice avec un faible rendement de 31% à partir de la lysine **7**. La D6C **15** permet d'obtenir un châssis dont les trois fonctions amines peuvent être déprotégées et fonctionnalisées de façon orthogonale. Ceci n'a pas été effectué dans le cadre de ce travail.

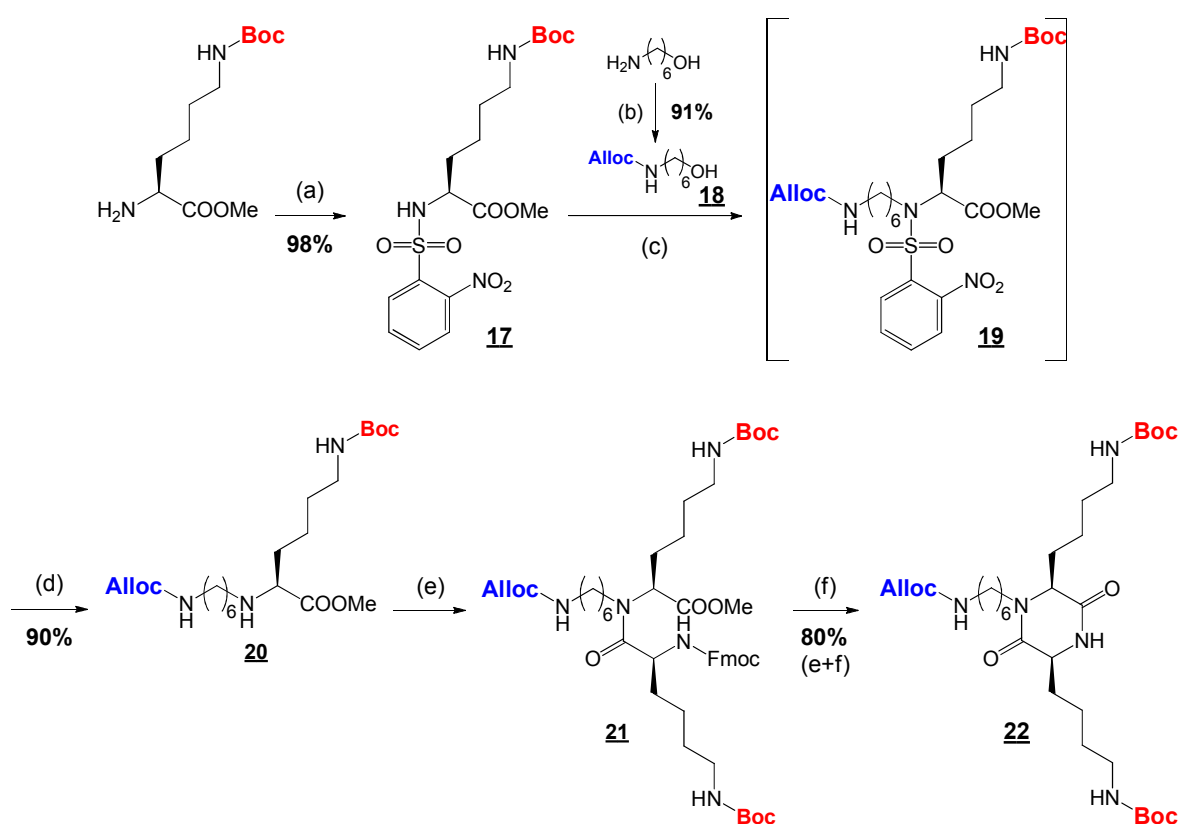
La D3C-Boc/Alloc **16** a été également produite à partir de la lysine **8** par couplage avec de la Fmoc-Gly-OH. Comme précédemment cette réaction de couplage a été effectuée sur un produit brut. Le dipeptide **14** est obtenu en mélange avec le PPh₃O après purification sur gel de silice. Après coupure du groupement Fmoc, la D3C **16** est isolée après purification sur gel de silice avec un rendement de 27% sur 4 étapes de

synthèse. La D3C **16** permet d'introduire, par exemple, un module de reconnaissance sur la chaîne latérale de la lysine et un élément de détection (fluorophore, radiomarquage) sur la chaîne alkyle dans le plan du cycle (cf. paragraphe II.3).

II.2.1.4. Variation des groupes protecteurs

Différents groupes protecteurs ont été utilisés sur les amines de la DCP pour permettre une fonctionnalisation plus variée du châssis.

Ainsi, le châssis D6C-Alloc/2Boc **22** comportant une amine protégée par un groupe Alloc dans le plan du cycle et deux groupes Boc sur les amines des chaînes latérales des lysines a été synthétisé (Fig. 54).



Réactifs : (a) *o*-NsCl, Et₃N, H₂O/dioxane (1:1) (b) AllocCl, Et₃N, DCM (c) **18**, PPh₃, DIAD, THF (d) PhSH, K₂CO₃, DMF (e) Fmoc-Lys(Boc)-OH, HATU, DIEA, DCM (f) pipéridine/DCM (2:8)

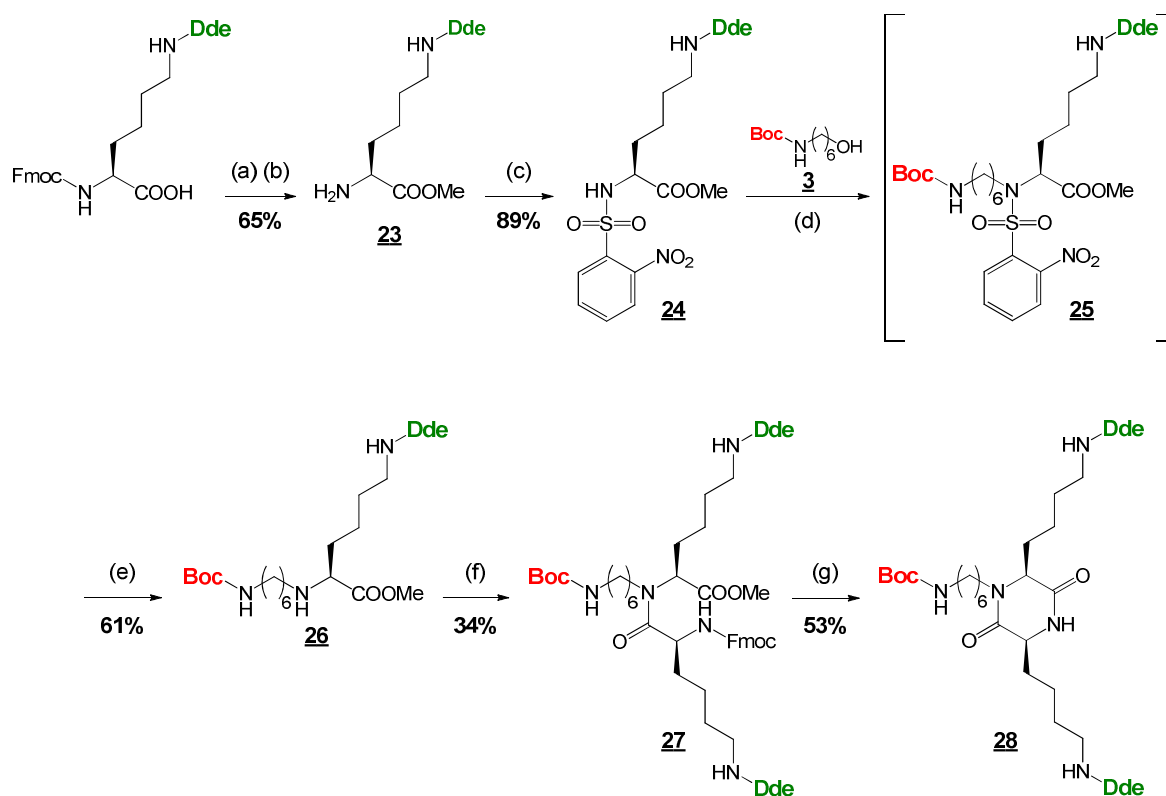
Fig. 54. Schéma de synthèse de la D6C-Alloc/2Boc **22**

La D6C-Alloc/2Boc **22** est synthétisée selon la même stratégie utilisée auparavant (Fig. 52) à partir des synthons **17** et **18** portant respectivement des groupes Boc et Alloc. La lysine **17** est produite à partir de la lysine commerciale H-Lys(Boc)-OH par substitution nucléophile sur le chlorure de nosyle avec un rendement de 98% (Fig. 54). L'alcool **18** est synthétisé par introduction d'un groupement Alloc sur l'amine du 6-aminohexan-1-ol par

substitution nucléophile sur le chlorure d'allylchloroformate avec un rendement de 91%. Suite à la réaction de Mitsunobu mettant en jeu la lysine **17** et l'alcool **18**, un mélange des composés **17**, **18** et **19** est obtenu après purification sur gel de silice. Après coupure du groupe nosyle par le PhSH en milieu basique (K_2CO_3), la lysine **20** est isolée avec un bon rendement de 90% après deux étapes de synthèse et de purifications sur gel de silice.

La Fmoc-Lys(Boc)-OH est ensuite couplée sur l'amine de la lysine **20**. La réaction est totale d'après la CCM. Le dipeptide **21** est obtenu après colonne sur gel de silice. Le produit brut est utilisé pour l'étape de cyclisation. Après coupure du groupement Fmoc en milieu basique (pipéridine), la D6C-Alloc/2Boc **22** est obtenue avec un rendement de 80% calculé sur deux étapes de synthèse (après deux étapes de purification sur gel de silice).

La synthèse d'un châssis dont les chaînes latérales des lysines sont protégées par des groupements Dde est décrite en Fig. 55.



Réactifs : (a) TMSCl, MeOH (b) piperidine/DCM (2:8), (c) *o*-NsCl, Et₃N, H₂O/dioxane (1:1) (d) **3**, PPh₃, DIAD, THF (e) Fmoc-Lys(Dde)-OH, HATU, DIEA, DMF (g) pipéridine/DCM (2:8)

Fig. 55. Schéma de synthèse de la D6C-Boc/2Dde **28**

La D6C-Boc/2Dde **28** a été synthétisée selon la même méthodologie de synthèse que précédemment. Des difficultés ont été rencontrées et les conditions de synthèse ont été adaptées par rapport aux précédentes. La réaction de Mitsunobu est difficile à suivre

par CCM car les rapports frontaux de la Nosyl-Lys(Dde)-OMe **24** et du PPh₃O sont identiques. Cependant l'avancement de la réaction peut être suivi en CLHP analytique. La réaction n'est pas totale et le PPh₃O est toujours présent après purification sur gel de silice. Cette impureté a pu être éliminée suite à la purification sur colonne de silice après la coupure du nosyle. La lysine N α alkylée **26** est ainsi obtenue avec un rendement de 61% (calculé sur deux étapes de synthèse). Le couplage de la Fmoc-Lys(Dde)-OH sur l'amine de la lysine **26** s'est avéré problématique. En effet la réaction évoluait peu dans le DCM. L'ajout de DMF a permis de former le dipeptide **27**. Ce dernier a été synthétisé avec 34% de rendement après purification sur gel de silice. Après cyclisation, la D6C-Boc/2Dde **28** est isolée après purification sur gel de silice avec un rendement de 53% et une pureté très satisfaisante (RMN¹H, SM, CLHP).

Le rendement global des sept étapes de synthèse est de 6%. Cette synthèse doit être optimisée (Mitsunobu et couplage du Fmoc-Acide Aminé-OH). La solubilité et la polarité des produits sont différentes de celles des produits des synthèses précédentes.

II.2.1.5. Conclusion

Les D6C-Boc/2Alloc **11** et D6C-Alloc/2Boc **22** ont été synthétisées avec les meilleurs rendements. Lorsque la stratégie de synthèse a été étendue en modifiant la nature du groupe protecteur (Dde) de la chaîne latérale de la lysine ou la longueur de la chaîne aminoalkyle quelques difficultés ont été rencontrées. L'étape la plus problématique est la réaction de Mitsunobu. En effet les rendements varient selon la nature des synthons utilisés. De plus, le PPh₃O est parfois difficile à éliminer lors de la purification et persiste lors des purifications de plusieurs étapes. Des phosphines pouvant être éliminées en phase aqueuse par extraction existent mais leur coût est élevé. Une alternative pourrait être l'utilisation de PPh₃ greffée sur un support solide. Le suivi de la réaction est également souvent difficile par CCM et CLHP.

II.2.2. Synthèse des inhibiteurs peptidiques

Deux séquences peptidiques, KLVFFA (A β ₁₆₋₂₁) et VQIVYK (tau₃₀₆₋₃₁₁), ciblant respectivement la fibrillation du peptide A β ₄₀ et de la protéine tau, ont été sélectionnées pour synthétiser des inhibiteurs multimériques à partir du châssis DCP. Ces peptides ont été couplés sur des châssis DCP soit par leur extrémité C-terminale par lien amide soit par leur extrémité N-terminale par lien éther d'oxime (Fig. 56).

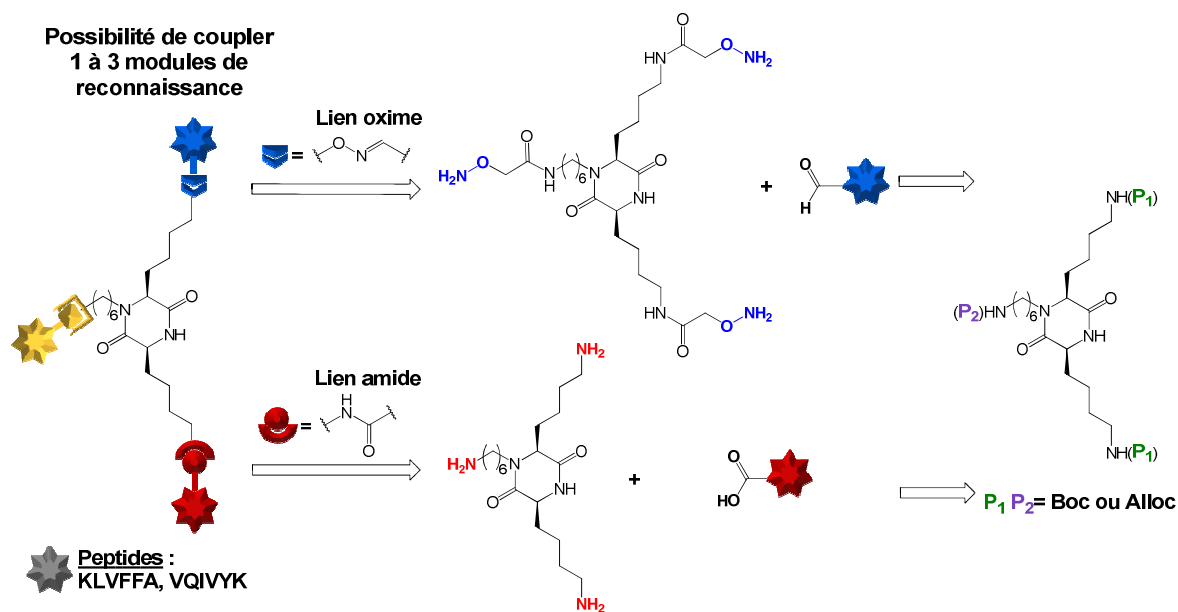


Fig. 56. Schéma de synthèse général des inhibiteurs peptidiques

Le lien éther d'oxime met en jeu une fonction oxyamine et une fonction carbonyle (Fig. 57)²³¹.

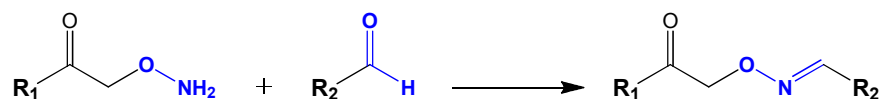


Fig. 57. Formation du lien éther d'oxime

Cette réaction est chimiosélective : elle ne nécessite pas la protection des autres fonctions réactives et l'utilisation d'agent de couplage ou de catalyseurs. Les rendements des réactions chimiosélectives sont élevés. Ce lien est particulièrement stable dans une gamme de pH allant de 2 à 9 et son hydrolyse à pH physiologique est extrêmement faible²³². Dans le cas d'un aldéhyde et d'une oxyamine aliphatique, les conditions optimales de couplage se situent entre pH 4 et 5. En milieu acide la formation de ce lien est quantitative et rapide mais extrêmement faible à pH 7. Le lien éther d'oxime est couramment utilisé pour l'assemblage de biomolécules^{137,138} comme des glycopeptides^{141,142} ou des conjugués peptides-oligonucléotides^{139,140}.

Les amines des châssis utilisés possèdent des groupes protecteurs orthogonaux permettant d'adresser sélectivement un à trois motifs de reconnaissance (Fig. 56). Afin de

231.(a) Jencks, W. P., Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation1. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81 (2), 475-481; (b) Rose, K., Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116 (1), 30-33.

232.Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (39), 7523-7526.

former le lien éther d'oxime, la ou les amines de la DCP doivent être fonctionnalisées en introduisant une fonction oxyamine.

Dans un premier temps la séquence KLVFFA, ciblant le peptide A β_{40} , est couplée *via* un lien amide par son extrémité C-terminale sur des châssis DCP (Fig. 56). Trois D6C ont été synthétisées présentant : un motif KLVFFA (D6C-AFFVLK/2Alloc), deux motifs (D6C-NH₂/2AFFVLK) et trois motifs (D6C-3AFFVLK). Les fonctions acides aux extrémités C-terminales des peptides sont couplées avec les fonctions amines portées par les châssis D6C. La formation d'un lien amide par couplage d'un acide carboxylique avec une amine nécessite l'activation de la fonction acide et la protection des autres fonctions réactives de la séquence peptidique.

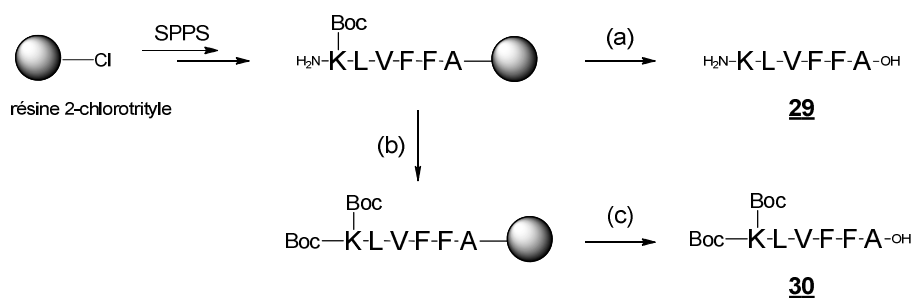
Dans un second temps les peptides KLVFFA et VQIVYK sont liés sur les DCP par leurs extrémités N-terminales par formation d'un lien éther d'oxime (Fig. 56). Les six D6C suivantes ont été synthétisées présentant : un motif (D6C-KLVFFA/2NH₂ et D6C-VQIVYK/2NH₂), deux motifs (D6C-NH₂/2KLVFFA et D6C-NH₂/2VQIVYK) et trois motifs (D6C-3KLVFFA et D6C-3VQIVYK). Les fonctions oxyamines sont introduites sur les fonctions amines des châssis D6C et les fonctions aldéhydes sont portées par les séquences peptidiques à leurs extrémités N-terminales. Ces assemblages permettent d'évaluer l'influence du sens de ligation du motif peptidique et également de comparer l'activité inhibitrice des composés à celle du cyclodécapeptide C2A β_{16-21} .

II.2.2.1. Couplage des séquences peptidiques par leurs extrémités C-terminales (lien amide)

A. Synthèse des peptides

La séquence peptidique KLVFFA est synthétisée par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) sur une résine 2-chlorotrityle selon une stratégie Fmoc/tBu (Fig. 58). La coupure de la résine en milieu acide fort permet de libérer et de déprotéger le peptide **29**. Le TIS et l'eau servent à piéger les carbocations libérés lors de cette étape. Ce peptide servira de témoin lors de l'évaluation biologique des composés.

La résine 2-chlorotrityle peut également être coupée en milieu acide faible (AcOH ou 1% de TFA) afin de conserver des groupes protecteurs acido-labiles tels que le groupement Boc ici. Le couplage de la séquence KLVFFA par son C-terminal nécessite la protection de tous les fonctions réactives de la séquence. Pour cela, la fonction amine de l'extrémité N-terminale du peptide a été protégée par un groupement Boc. Le peptide **30** est obtenu après coupure de la résine en milieu légèrement acide (1% de TFA).



Réactifs : (a) TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5) (b) Boc₂O, DCM, DIEA (c) TFA/DCM (1:99)

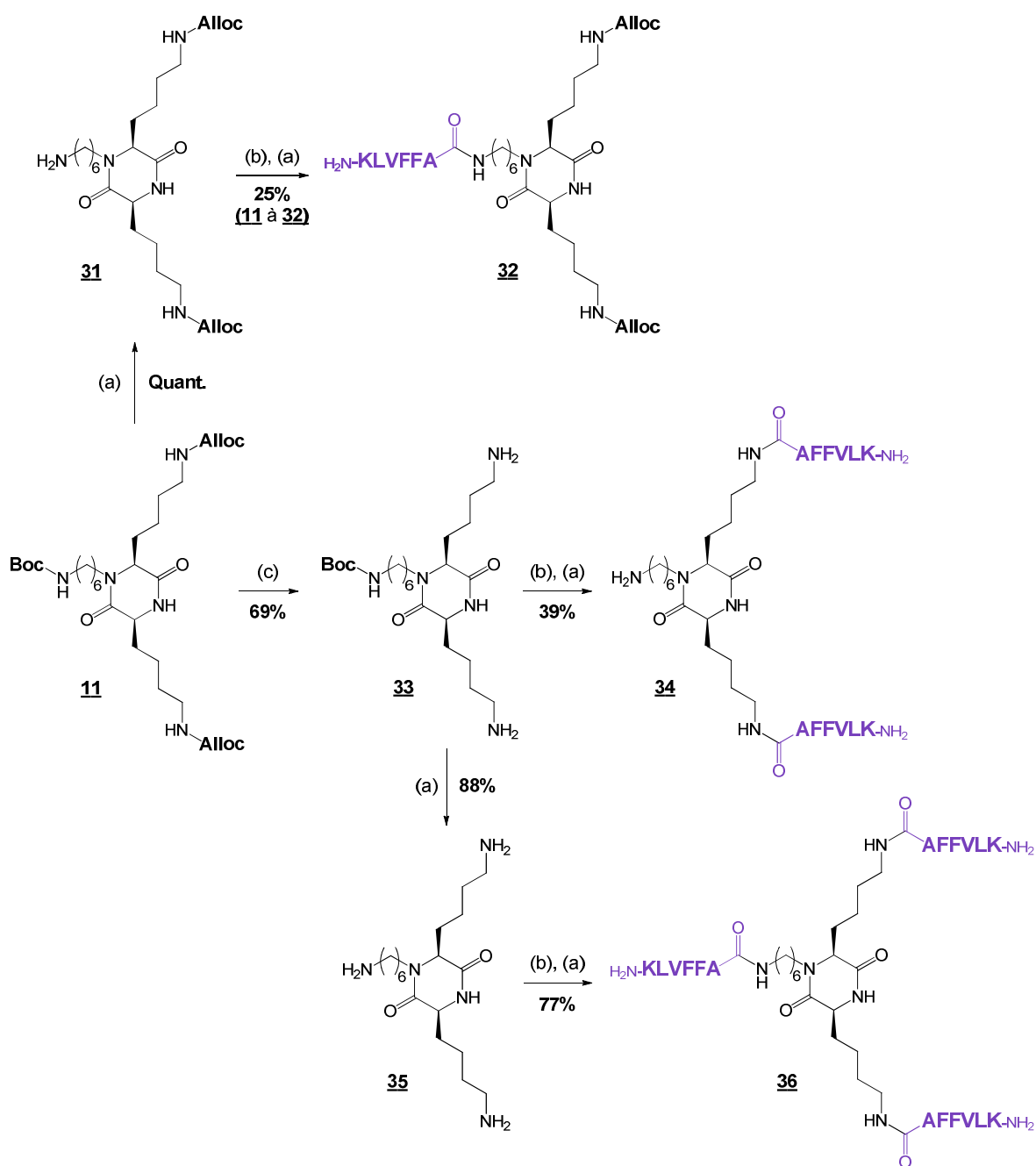
Fig. 58. Synthèse des peptides KLVFFA 29 et (Boc)₂KLVFFA 30

B. Couplage des séquences peptidiques

Le couplage du peptide KLVFFA par lien amide sur le châssis DCP 11 a conduit à trois assemblages présentant un, deux ou trois motifs peptidiques liés par leurs extrémités C-terminales (Fig. 59). La déprotection sélective des amines de 11 permet de moduler le nombre de sites de couplage.

La DCP présentant un peptide KLVFFA, D6C-AFFVLK/2Alloc 32, a été synthétisée à partir de la D6C-NH₂/2Alloc 31 (Fig. 59) et la séquence peptidique 30. La D6C 31 est obtenue après coupure du groupement Boc de la D6C 11 en milieu acide avec un rendement quantitatif. La fonction acide du peptide 30 est ensuite activée par l'agent de couplage PyBOP pour se coupler à l'amine libre de la D6C 31. Après coupure des groupements Boc de la séquence peptidique, la D6C-AFFVLK/2Alloc 32 est isolée avec 25% de rendement après purification par CLHP préparative. Les groupements Alloc sont conservés.

Deux motifs peptidiques ont ensuite été couplés sur le châssis D6C 11 en coupant dans un premier temps les groupements Alloc (Fig. 59). Les deux amines des chaînes latérales des lysines de la D6C 11 sont déprotégées en présence de Pd(PPh₃)₄ pour accéder à la D6C-Boc/2NH₂ 33 avec un rendement de 69% après filtration sur gel de silice. Le peptide 30 est couplé sur le châssis 33 comme précédemment en présence de PyBOP. Après coupure des groupements Boc des séquences peptidiques et du châssis, puis purification par CLHP préparative la D6C-NH₂/2AFFVLK 34 est isolée avec 39% de rendement.



Réactifs : (a) TFA/DCM (1:1) (b) **30**, PyBOP, DIEA, DCM/DMF (2:1) (c) $\text{Pd(PPh}_3)_4$, PhSiH_3 , DCM

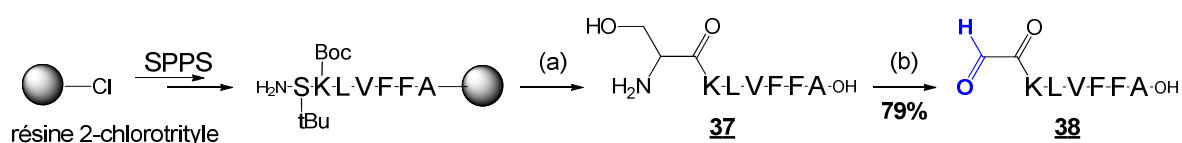
Fig. 59. Synthèse des DCP présentant les motifs KLVFFA liés par leur C-terminal

Enfin, trois motifs peptidiques **30** sont couplés selon la même stratégie sur le châssis D6C/3NH₂ **35** possédant trois amines libres (Fig. 59). Ce dernier est obtenu par coupure du groupement Boc de la D6C **33** en milieu acide avec 88% de rendement. Après déprotection en milieu acide et purification par CLHP préparative, le composé D6C-NH₂/3AFFVLK **34** a été synthétisé avec 77% de rendement. Les trois produits et les intermédiaires ont été caractérisés par spectrométrie de masse.

II.2.2.2. Couplage des séquences peptidiques par leurs extrémités N-terminales (lien éther d'oxime)

A. Synthèse des peptides

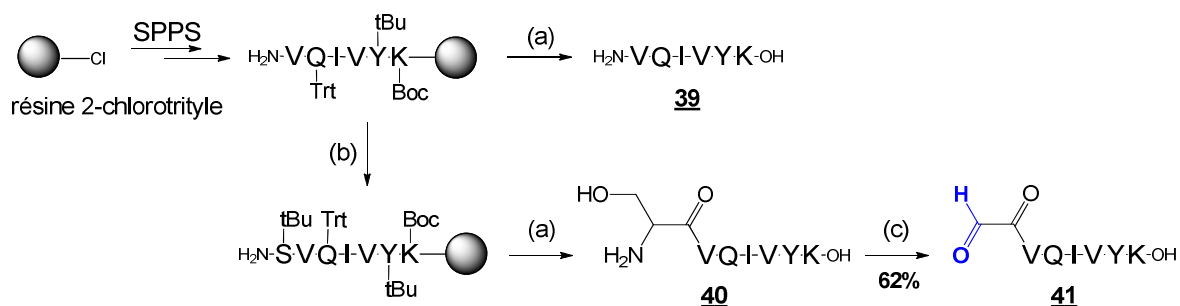
Nous avons ensuite lié les séquences peptidiques KLVFFA ($A\beta_{16-21}$) et VQIVYK ($\tau_{306-311}$) par leurs extrémités N-terminales sur des châssis D6C par lien éther d'oxime. Pour cela, nous avons choisi d'introduire une à trois fonctions oxyamines sur le châssis DCP et une fonction aldéhyde à l'extrémité N-terminale des séquences peptidiques. Un moyen de produire facilement cette fonction est de coupler une sérine à l'extrémité N-terminale du peptide dont la fonction 1,2-aminoalcool peut subir une coupure oxydante par le périodate de sodium. Le peptide SKLVFFA **37** est obtenu après assemblage par SPPS (stratégie Fmoc/tBu) à partir d'une résine 2-chlorotrityle puis libération du peptide en milieu acide et purification par CLHP préparative (Fig. 60). Le peptide **38** est synthétisé avec un rendement de 79% après oxydation en présence de $NaIO_4$ et une étape de purification par CLHP préparative. Cette étape a dû être optimisée du fait du peu de solubilité du peptide **37**. Le ratio 2:3 (CH_3CN/H_2O acidifiée avec 0,1% de TFA) est optimal. La limite de solubilité de 5 mg/mL pour le peptide **37** doit être respectée afin d'éviter la formation d'un gel.



Réactifs : (a) TFA/TIS/ H_2O (95:2,5:2,5) (b) $NaIO_4$, CH_3CN/H_2O acidifiée avec 0,1% de TFA (2:3)

Fig. 60. Synthèse du peptide aldéhyde OHC-KLVFFA **38**

Le peptide VQIVYK dont les fonctions réactives des chaînes latérales sont protégées par des groupes acido-labiles, a été assemblé par SPPS sur résine 2-chlorotrityle (Fig. 61) dans les mêmes conditions utilisées précédemment. Ce peptide est le précurseur du peptide **40** possédant une sérine à son extrémité N-terminale. Le peptide **39** est obtenu après coupure du peptide de la résine en milieu fortement acide et purification par CLHP préparative. Ce peptide servira également de témoin pour les tests biologiques.



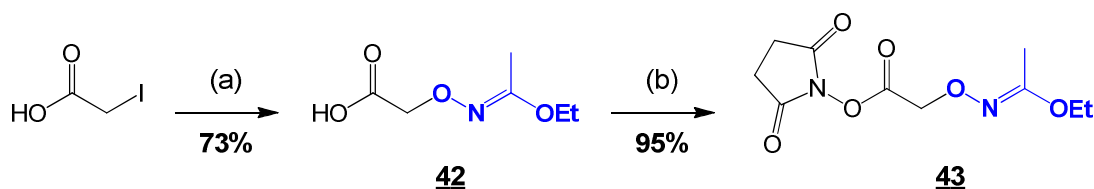
Réactifs : (a) TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5) (b) (Boc)Ser(tBu)-OH, PyBOP, DIEA, DMF (c) NaIO₄, CH₃CN/H₂O acidifiée avec 0,1% de TFA (2:3)

Fig. 61. Synthèse des peptides VQIVYK 39 et 41

Le peptide SVQIVYK dont les fonctions des chaînes latérales sont protégées par des groupes acido-labiles, est obtenu par introduction d'une (Boc)Ser(tBu)-OH dans les conditions classiques de couplage de SPPS (Fig. 61). Le peptide 40 est libéré de la résine par un traitement acide puis est purifié par CLHP préparative. Après oxydation avec le périodate de sodium et purification par CLHP préparative, le peptide 41 est obtenu avec 62% de rendement. Cette étape s'est également avérée problématique du fait du manque de solubilité des produits. La formation de gel a été observée et les conditions de réaction ont dû également être optimisées.

B. Synthèse des assemblages par lien éther d'oxime

La fonction oxyamine protégée par un groupement acétimide est introduite sur une ou plusieurs amines des châssis DCP *via* un ester activé (composé 43 Fig. 62)²³³. Ce composé est synthétisé à partir de l'acide iodoacétique. La fonction oxyamine est introduite par substitution nucléophile de l'iode par le N-hydroxyacétimide (composé 42). La fonction acide est activée sous forme d'ester N-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de DCC (composé NHS-Aoa-Acm 43).



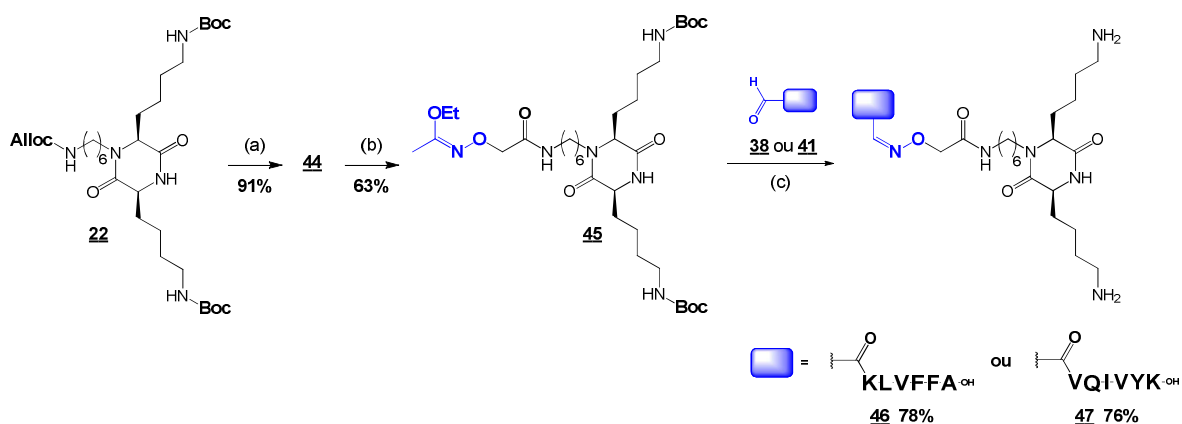
Réactifs : (a) N-hydroxyacétimide, NaOH, H₂O, 80 °C (b) N-hydroxysuccinimide, DCC, AcOEt/dioxane (1:1)

Fig. 62. Synthèse du NHS-Aoa-Acm 43

233.Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturny, D.; Dumy, P., 1-Ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminoxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (3), 983-991.

La formation du lien éther d'oxime se fait généralement à pH 4-5 dans l'eau à une température de 37 °C. Cependant la réaction peut également être réalisée à pH plus acide ce qui permet de couper les groupements Boc et Acétimide simultanément à la formation du lien éther d'oxime¹³⁸.

Les D6C **46** et **47** présentant un motif peptidique sont obtenues à partir de la D6C **45** possédant une fonction oxyamine (protégée par un groupe acido-labile) et des séquences peptidiques **38** et **41** portant une fonction aldéhyde en N-terminal. La D6C-NH₂/2Boc **44** est synthétisée à partir de la D6C-Alloc/2Boc **22** dont le groupe Alloc est coupé en présence de Pd(PPh₃)₄ (Fig. 63). La D6C **44** est obtenue avec 91% de rendement après filtration sur gel de silice. Le couplage du composé **43** sur l'amine de la D6C **44** permet d'accéder au châssis D6C-Acm/2Boc **45** présentant une fonction oxyamine protégée par un groupe acétimide dans le plan du cycle. La D6C-Acm/2Boc **45** est obtenue avec un rendement de 63% après purification par CLHP préparative.



Réactifs : (a) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM (b) **43**, DMF, DIEA (c) **38** ou **41**, CH₃CN/H₂O/TFA (3:2:5), 37 °C

Fig. 63. Synthèse des D6C présentant un motif peptidique

Une séquence peptidique est ensuite introduite sur le châssis D6C-Acm/2Boc **45** (Fig. 63). Ainsi, la synthèse des composés **46** et **47** se fait en présence de 50% de TFA. 30% de CH₃CN sont également ajoutés pour augmenter la solubilité des séquences peptidiques **38** et **41**. Les D6C-KLVFFA/2NH₂ **46** et D6C-VQIVYK/2NH₂ **47** sont ainsi obtenues avec respectivement 78 et 76% de rendements après purification par CLHP préparative. Les produits sont caractérisés par spectrométrie de masse.

La même stratégie de synthèse est appliquée pour synthétiser les D6C-NH₂/2KLVFFA **49** et D6C-NH₂/2VQIVYK **50** (Fig. 64). La D6C **48** portant deux fonctions oxyamines protégées par un groupe acétimide est obtenue par couplage de l'ester activé **43** sur la D6C-Boc/2NH₂ **33** avec 54% de rendement (après purification par CLHP préparative). L'utilisation de la D6C **33** permet d'avoir un groupement Boc acido-labile

33 $\xrightarrow{(a)}$ **48** (54%)

48 $\xrightarrow{(b)}$ **50** (26%)

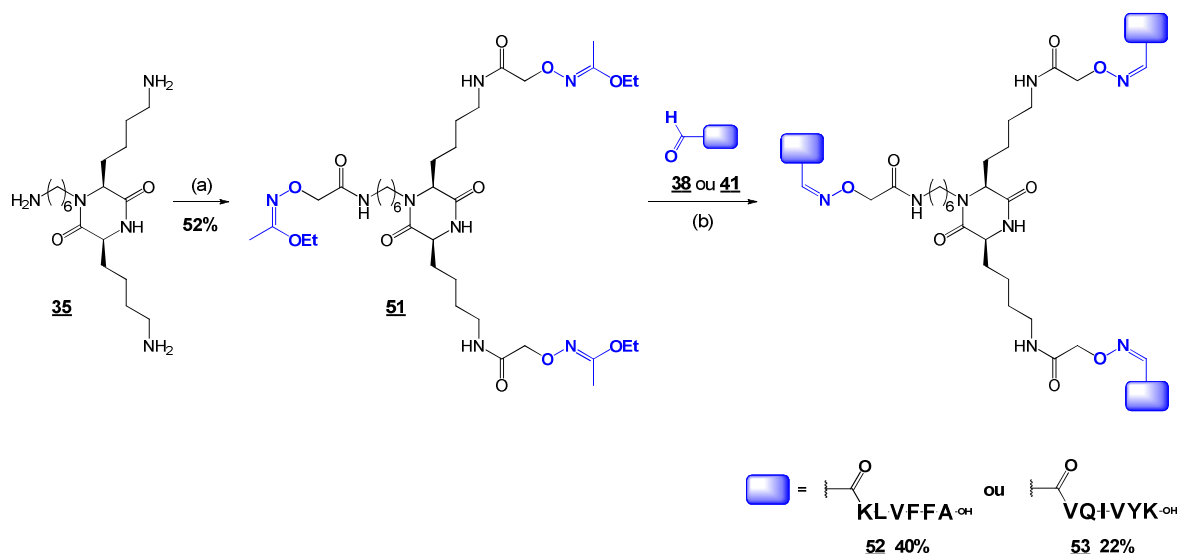
(b) reagent: **38** ou **41**

Legend: = $\text{KLVFFA}^{-\text{OH}}$ ou $\text{VQIVYK}^{-\text{OH}}$

Fig. 64. Synthèse des D6C présentant deux motifs peptidiques

113

pour la D6C-3VQIVYK **53**. Ces assemblages ont été caractérisés par spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) **43**, DMF, DIEA (b) **38** ou **41**, CH₃CN/H₂O/TFA (3:2:5), 37 °C

Fig. 65. Synthèse des D6C-3KLFFFA **52 et D6C-3VQIVYK **53****

II.2.3. Synthèse des inhibiteurs hétéroaromatiques

Des hétérocycles aromatiques ont été également introduits sur le châssis DCP (Fig. 67). Pour cela, une réaction chimiosélective a été utilisée : la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I). Cette réaction met en jeu une fonction alcyne et une fonction azoture pour former régiosélectivement en présence de Cuivre (I) un lien 1,4-triazole (Fig. 66).

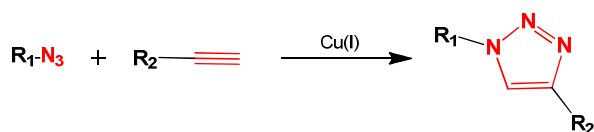


Fig. 66. Formation du lien 1,4-triazole par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I)

Cette réaction a été mise au point par Huisgen en 1963²³⁴. A l'origine, cette cycloaddition 1,3 dipolaire nécessitait un apport énergétique important et délivrait deux regioisomères 1,4 et 1,5 dans des proportions équivalentes. En 2002, Sharpless et Meldal remettent cette réaction au goût du jour en rendant cette réaction régiosélective et en

234. Huisgen, R., Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2 (11), 633-645.

augmentant sa cinétique de formation grâce à l'utilisation du Cu(I) comme catalyseur²³⁵. Cette réaction, communément appelée CuAAC (Copper catalyzed Azide alkyne Cycloaddition), fut rapidement utilisée en tant que ligation chimiosélective dans une multitude de domaines (conjugaison de biomolécules, dendrimères, ligation sur surface, librairie combinatoire...)^{236,237}. En effet, les fonctions azoture et alcyne sont particulièrement inertes envers une large variété de produits chimiques et stables dans les conditions de synthèse de biomolécules. Par ailleurs les caractéristiques spatiales et électroniques du triazole font de ce dernier un excellent bioisostère de la liaison amide *trans* à la différence près qu'il est stable à l'hydrolyse et aux protéases. Cette ligation est une réaction particulièrement robuste pouvant s'effectuer dans une large variété de solvants dans une gamme de pH allant de 7 à 9. Le facteur le plus important est de maintenir le cuivre à un degré d'oxydation I tout au long de la réaction. C'est pourquoi, il existe de nombreuses conditions opératoires, plus ou moins efficaces, employant diverses sources de cuivre pour la formation de Cu(I) (CuSO₄/Ascorbate de sodium, CuBr, CuI, nanopoudre de cuivre...)^{236,237}. La procédure la plus utilisée pour la formation de Cu(I) est obtenue par réduction du sulfate de Cu(II) par l'ascorbate de sodium. Bien qu'efficace, cette méthode présente quelques inconvénients comme la production de peroxyde d'hydrogène *in situ* pouvant oxyder certains résidus peptidiques (Histidine, Cystéine, Méthionine) ou induire des coupures des biomolécules. De nombreuses études se sont penchées sur l'optimisation de cette ligation et ont montré que l'utilisation d'un ligand stabilisant le Cu(I) permet d'augmenter la cinétique, le rendement de la réaction et limite les oxydations néfastes^{237,238,239}.

Les fonctions azotures sont introduites sur les châssis moléculaires D6C en transformant la fonction amine en azoture (Fig. 67). Les fonctions alcynes sont portées par des composés hétérocycliques.

235.(a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.* **2002**, *114* (14), 2708-2711; (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase:[1,2,3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064.

236.(a) Angell, Y. L.; Burgess, K., Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (10), 1674-1689; (b) Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952-3015.

237.Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8794-8804.

238.Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (52), 9879-9883.

239.Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P., Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (35), 8051-8056.

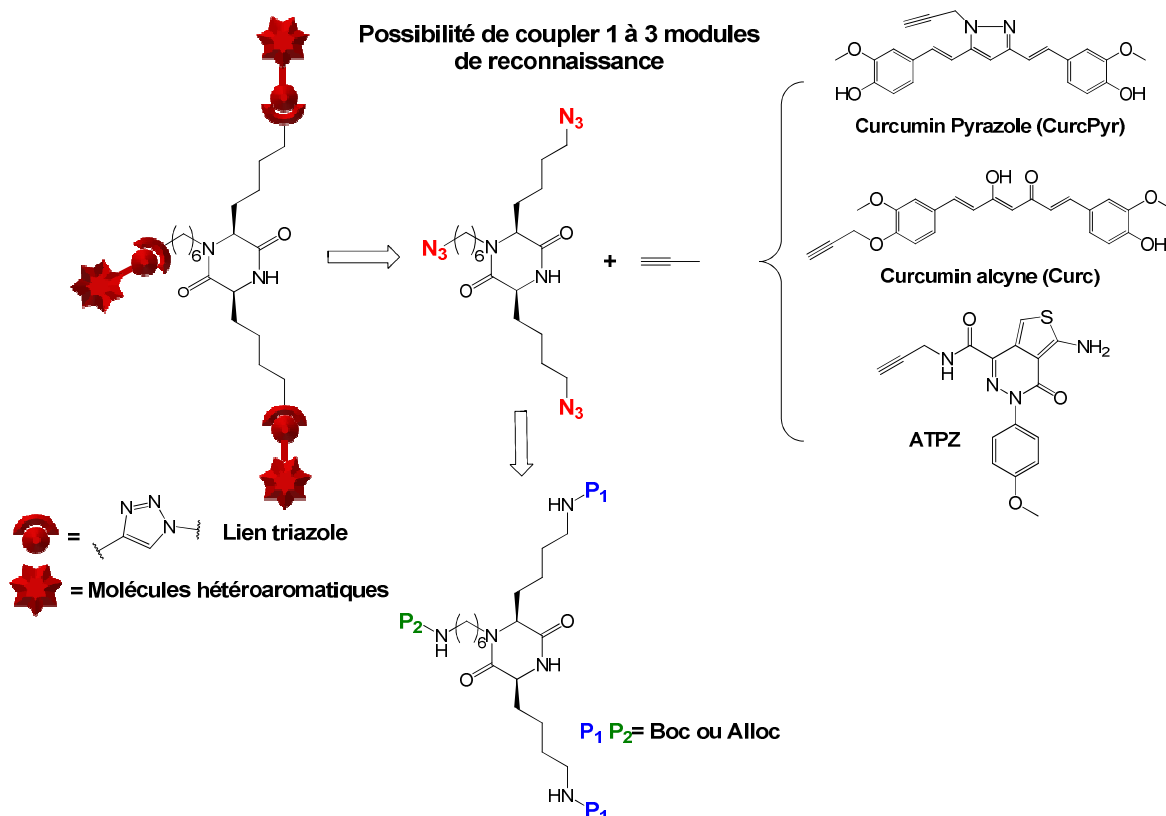


Fig. 67. Schéma général des assemblages présentant des composés hétéroaromatiques

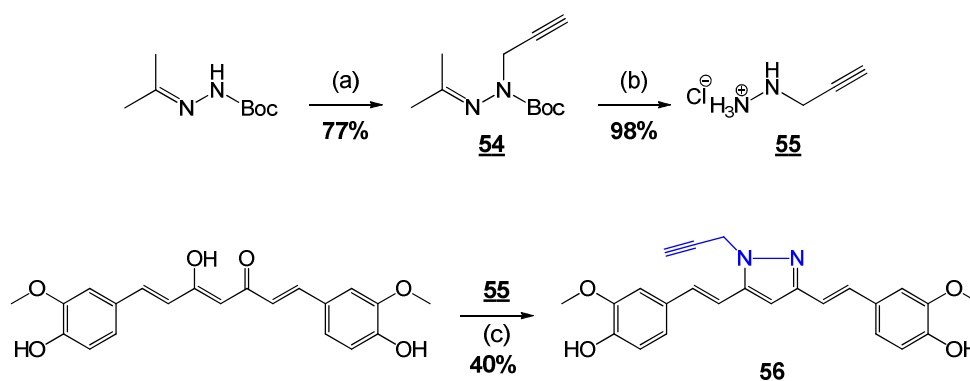
Le curcumin, connu pour inhiber la fibrillation de l'A β_{40} , a été modifié dans un premier temps au niveau d'un de ses cycles phénoliques par introduction d'une fonction alcyne. Une second dérivé du curcumin a été utilisé. Ce dernier correspond à la transformation de la fonction céto-énolique du curcumin en cycle pyrazole sur lequel est branchée une fonction alcyne. D'après les travaux de Narlawar et al¹⁹⁵, ce composé possède une bonne activité inhibitrice de la fibrillation de la protéine tau alors qu'il est peu actif envers la fibrillation du peptide A β_{42} . Une troisième molécule hétérocyclique a été utilisée : une aminothiényropyridazine (ATPZ) dont le cycle pyridazine est substitué par une fonction alcyne. D'après la relation structure-activité établie par Crowe et al²¹⁷, une modification sur cette position ne perturbe pas l'activité biologique de façon dramatique. D'après ces travaux, l'ATPZ possède une activité inhibitrice spécifique de la fibrillation de la protéine tau.

II.2.3.1. Assemblages présentant les dérivés du curcumin

A. Fonctionnalisation du curcumin

Le curcumin a été modifié de deux manières afin d'introduire des fonctions alcynes. La première modification a été effectuée au niveau de la fonction céto-énolique du curcumin par formation d'un cycle pyrazole sur lequel est greffé un groupe alcyne.

Ainsi, le curcumin pyrazole **56** est obtenu par condensation de la prop-2-ynylhydrazine **55** sur le curcumin (Fig. 68). Dans un premier temps, le chlorhydrate de la prop-2-ynylhydrazine **55** est synthétisé d'après la synthèse développée par Meyer et *al*²⁴⁰. Le *tert*-butylisopropylidène carbazate est alkylé par substitution nucléophile du 3-bromoprop-1-yne en milieu basique et en présence d'un agent de transfert de phase dans le toluène à 80 °C. Le composé **54** est obtenu avec 77% de rendement après purification sur gel de silice. (Fig. 68). Après déprotection des amines en présence d'acide chlorhydrique, le sel d'hydrazine **55** est obtenu avec 98% de rendement sans étape de purification supplémentaire.



Réactifs : (a) 3-bromoprop-1-yne, KOH, Bu₄NHSO₄, toluène, 80 °C (b) HCl, THF, reflux (c) **55**, MeOH/AcOH (9:1), reflux

Fig. 68. Synthèse du curcumin pyrazole alkyne **56**

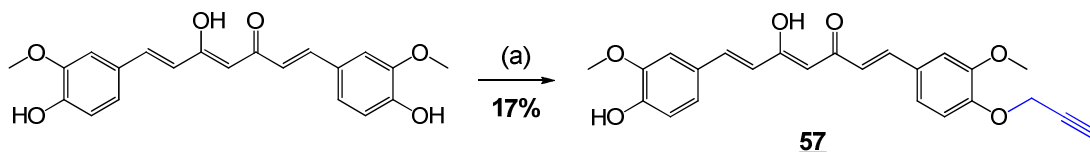
Dans un second temps, la condensation du composé **55** sur le curcumin est réalisée dans des conditions adaptées à partir des travaux de Narlawar et *al*¹⁹⁵. En milieu faiblement acide (10% d'acide acétique) le composé **55** réagit sur la fonction céto-énolique du curcumin pour former un cycle pyrazole après 72 h de chauffage à reflux (Fig. 68). Le composé **56** est obtenu après purification sur gel de silice avec 40% de rendement. Le faible rendement est dû à une mauvaise solubilité du produit et par conséquent à sa purification difficile sur gel de silice.

La seconde modification consiste à introduire une fonction alkyne sur un des cycles phénoliques du curcumin par étherification (composé **57**, Fig. 69). Cette synthèse a été développée par Shi et *al*²⁴¹. Afin d'effectuer majoritairement l'étherification d'une seule fonction phénol du curcumin, 1,2 équivalents de 3-bromoprop-1-yne sont utilisés. La réaction est réalisée en milieu basique dans le DMF à reflux. Après 72 h de réaction, un

240. Meyer, K. G., Simple Preparation of Monoalkylhydrazines. *Synlett* **2004**, 2004 (EFirst), 2355-2356.

241. Shi, W.; Dolai, S.; Rizk, S.; Hussain, A.; Tariq, H.; Averick, S.; L'Amoreaux, W.; El Idrissi, A.; Banerjee, P.; Raja, K., Synthesis of monofunctional curcumin derivatives, clicked curcumin dimer, and a PAMAM dendrimer curcumin conjugate for therapeutic applications. *Org. Lett.* **2007**, 9 (26), 5461-5464.

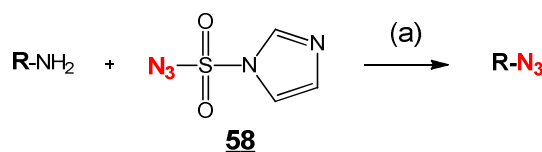
mélange contenant le curcumin, le composé **57** monoalkylé et le composé bisalkylé est obtenu. La purification par colonne sur gel de silice est difficile et une étape supplémentaire de purification par CLHP préparative a été nécessaire. Le composé **57** est synthétisé avec 17% de rendement.



Réactifs : (a) 3-bromoprop-1-yne, K_2CO_3 , DMF, reflux

Fig. 69. Synthèse du curcumin alcyne **57**

Les châssis D6C comportant les fonctions azotures sont synthétisés par transformation directe des fonctions amines libres en fonctions azotures par réaction de diazotransfert. Cette réaction nécessite l'utilisation d'un agent de diazotransfert (Fig. 70), l'azoture d'imidazole-1-sulfonyl (molécule **58**)²⁴². Cette réaction est catalysée par du Zn(II). Le Cu(II) peut être également utilisé mais il a été également démontré que l'utilisation de Zn(II) permet de raccourcir les temps de réaction²⁴³. La réaction de diazotransfert est chimiquement compatible avec les groupements Boc et Alloc¹³⁸.



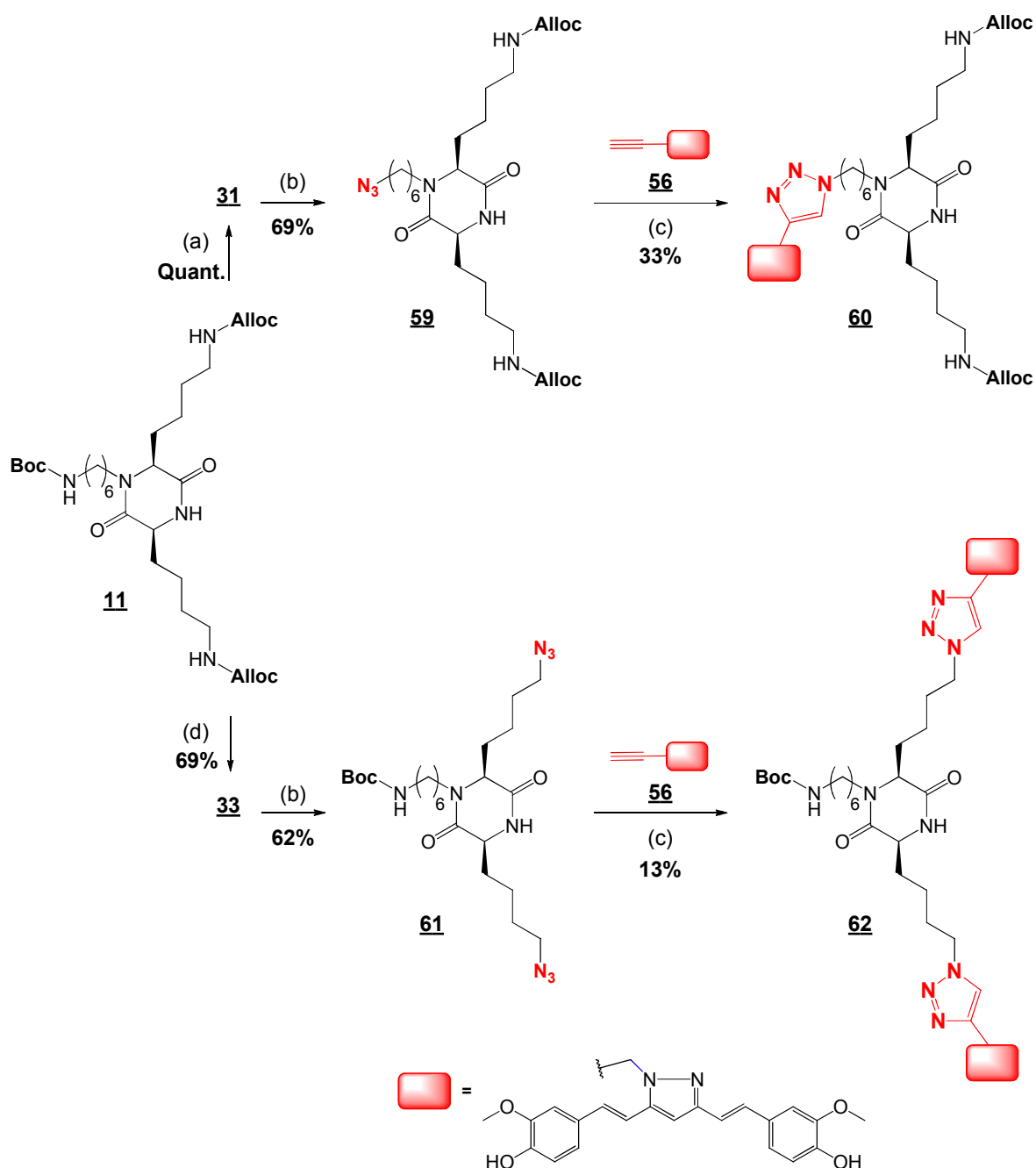
Réactifs : (a) $ZnCl_2$, K_2CO_3 , DCM/MeOH/ H_2O

Fig. 70. Réaction de diazotransfert

Les assemblages **60** et **62** présentant respectivement un ou deux motifs curcumin pyrazole sont obtenus par CuAAC à partir des châssis **59** et **61** portant une ou deux fonctions azotures et du dérivé pyrazole du curcumin **56** (Fig. 71). Le châssis D6C- N_3 /2Alloc **59** est synthétisé par introduction d'une fonction azoture *via* le réactif **58** en milieu basique et en présence de chlorure de Zn(II) sur la D6C- NH_2 /2Alloc **31** (Fig. 71). La D6C- N_3 /2Alloc **59** est obtenue après purification sur gel de silice avec un rendement de 69% (calculé sur deux étapes à partir de **11**). Le dérivé du curcumin **56** est ensuite couplé sur le châssis D6C- N_3 /2Alloc **59** par CuAAC. La D6C-CurcPyr/2Alloc **60** est isolée avec 33% de rendement après purification par CLHP préparative.

242. Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, 9 (19), 3797-3800.

243. Nyffeler, P. T.; Liang, C.-H.; Koeller, K. M.; Wong, C.-H., The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (36), 10773-10778.



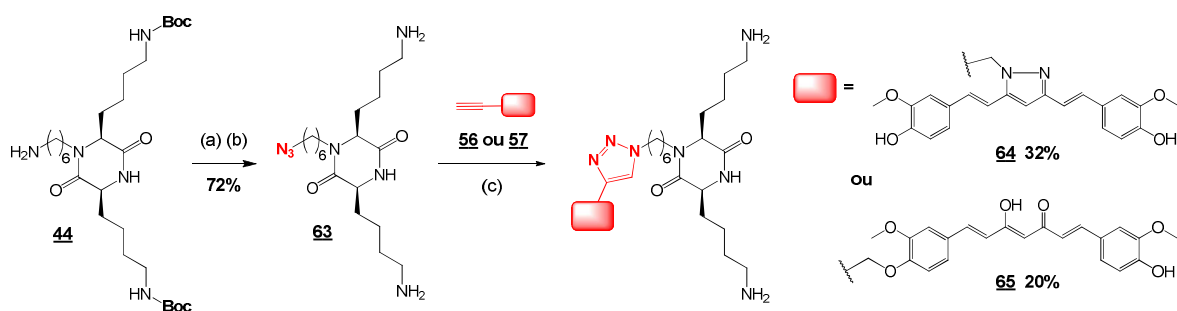
Réactifs : (a) TFA/DCM (1:1) (b) **58**, ZnCl₂, K₂CO₃, DCM/MeOH/H₂O (2:2:1) (c) **56**, CuSO₄, Ascorbate de sodium, DMF/H₂O (1:1) (d) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM

Fig. 71. Synthèse des D6C présentant un ou deux motifs curcumin pyrazole

La réaction de diazotransfert utilisant le réactif **58** permet d'incorporer deux azotures sur les amines libres du châssis D6C-Boc/2NH₂ **33** (Fig. 71). Le châssis D6C-Boc/2N₃ **61** est ainsi obtenu avec 62% de rendement après purification par CLHP préparative. Le dérivé **56** du curcumin est introduit sur la D6C **61** par CuAAC. La D6C-Boc/2CurPyr **62** est obtenue avec 13% de rendement après purification par CLHP préparative.

Les assemblages **60** et **62** sont caractérisés par spectrométrie de masse. Les faibles rendements obtenus pour ces essais sont attribués à la faible solubilité des produits. En effet, nous avons choisi ici de conserver les groupes protecteurs du châssis DCP. De plus, des précipités sont obtenus et les temps de réaction sont trop longs. Pour contourner ces difficultés, un ligand du cuivre, le THPTA (tris(hydroxy-propyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthylamine)) a été utilisé et les fonctions amines des châssis DCP ont été préalablement déprotégées.

Les D6C **64** et **65** présentant un motif curcumin sont obtenues par couplage par CuAAC des dérivés **56** et **57** sur le châssis D6C-N₃/2NH₂ **63** (Fig. 72). Une meilleure solubilité des produits est observée et aucun précipité n'est formé en présence du ligand THPTA. Les D6C-CurcPyr/2NH₂ **64** et D6C-Curc/2NH₂ **65** sont synthétisées avec des rendements respectifs de 32 et 20% après purification par CLHP préparative.

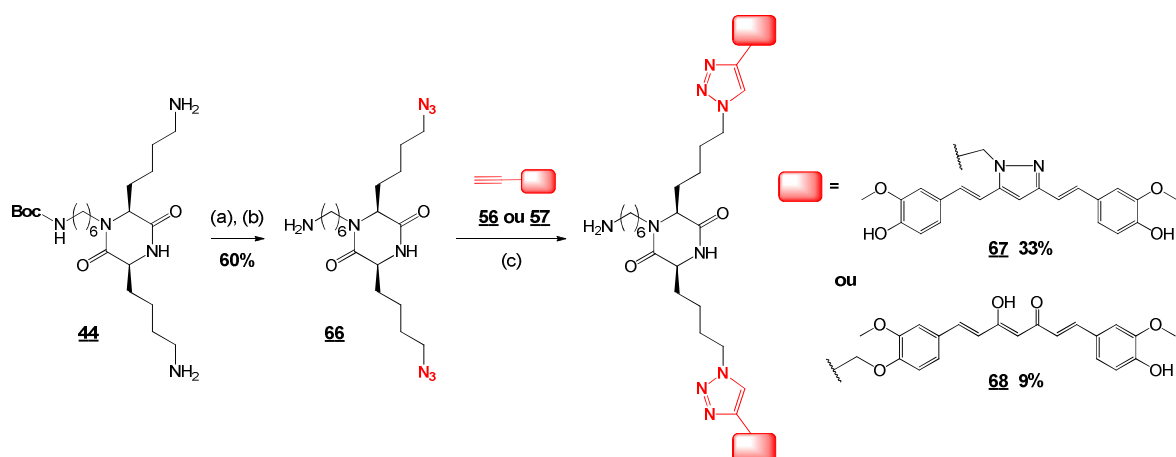


Réactifs : (a) **58**, ZnCl₂, K₂CO₃, DCM/MeOH/H₂O (2:2:1) (b) TFA/DCM (1:1) (c) **56** ou **57**, CuSO₄, Ascorbate de sodium, THPTA, DMF/HEPES (1:1)

Fig. 72. Synthèse des D6C présentant un motif curcumin

De la même manière, les assemblages présentant deux motifs curcumin sont synthétisés par CuAAC des dérivés **56** et **57** sur le châssis D6C-NH₂/2N₃ **66**. Ce dernier est produit à partir de la D6C-Boc/2NH₂ **44** (Fig. 73) avec un rendement de 60% (sur deux étapes de synthèse). Les D6C-2CurcPyr **67** et D6C-2Curc **68** sont obtenues avec des rendements respectifs de 33 et 9% après purification par CLHP préparative.

Ces quatre assemblages sont caractérisés par spectrométrie de masse. Les faibles rendements obtenus en général sont dus au manque de solubilité des produits dans les solvants utilisés pour la CLHP.

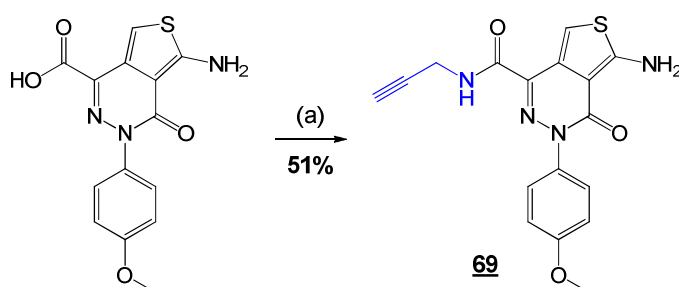


Réactifs : (a) 58, ZnCl_2 , K_2CO_3 , DCM/MeOH/ H_2O (2:2:1) (b) TFA/DCM (1:1) (c) 56 ou 57, CuSO_4 , Ascorbate de sodium, THPTA, DMF/HEPES (1:1)

Fig. 73. Synthèse des D6C présentant deux motifs curcumin

II.2.3.2. Assemblages présentant un dérivé ATPZ

Les ATPZ sont des inhibiteurs de la fibrillogénèse de la protéine tau. Le dérivé présenté en Fig. 74 a été choisi car sa fonction acide peut être modifiée sans perte dramatique d'activité biologique, d'après l'étude de relation structure-activité réalisée par Crowe et al.²¹⁷. Cette ATPZ a été obtenue en 6 étapes selon les protocoles décrits dans la littérature^{217,218,219}. Afin de conjuguer ce composé par lien triazole sur la DCP, une fonction alcyne a été introduite par lien amide sur l'ATPZ *via* cette fonction acide (Fig. 74). La propargylamine a été couplée avec l'acide carboxylique de l'ATPZ en présence d'un agent de couplage, le PyBOP. Après cristallisation le composé 69 est obtenu avec un rendement de 51% et une bonne pureté (CLHP, SM et RMN¹H).

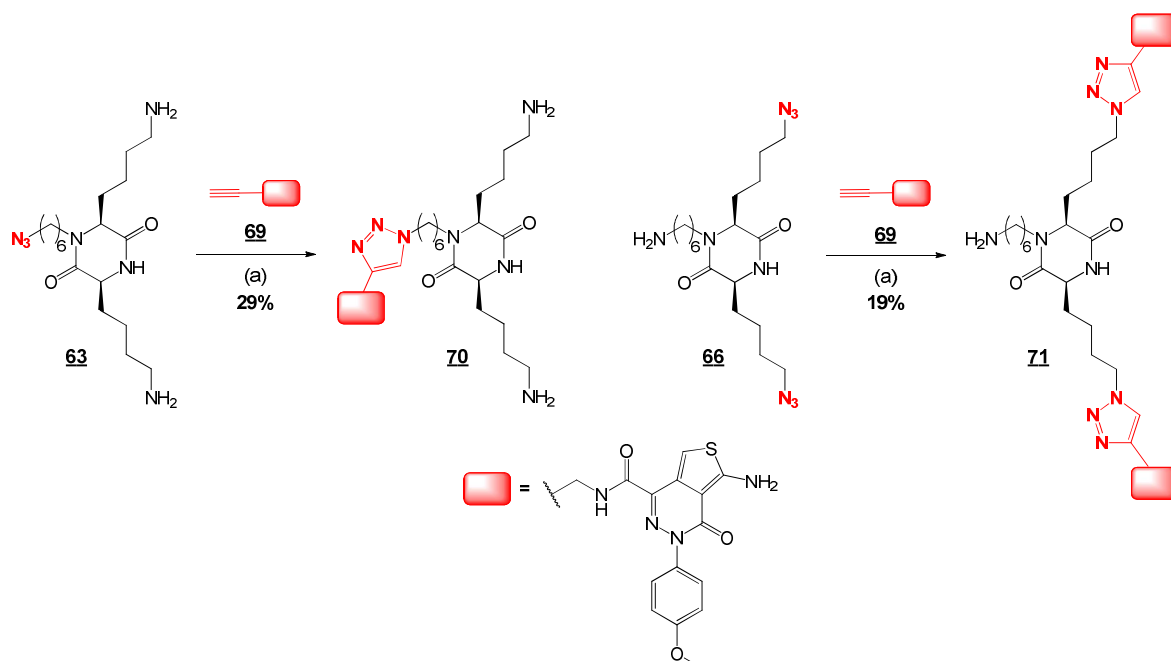


Réactifs : (a) propargylamine, PyBOP, DIEA, DMF

Fig. 74. Synthèse de l'ATPZ alcyne 69

Le dérivé alcyne 69 de l'ATPZ a ensuite été lié sur les châssis D6C- N_3 /2 NH_2 63 et D6C- NH_2 /2 N_3 66 par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I) dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les composés curcumin (Fig. 75). Les D6C-ATPZ/2 NH_2 70 et D6C- NH_2 /2ATPZ 71 sont synthétisées avec des rendements

respectifs de 29% et 19% après purification par CLHP préparative. La caractérisation de ces composés est effectuée par spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) 69, CuSO₄, AscNa, THPTA, DMF/HEPES (1:1)

Fig. 75. Synthèse des D6C-ATPZ/2NH₂ 70 et D6C-NH₂/2ATPZ 71

II.2.4. Synthèse d'un inhibiteur « mixte »

Un troisième type d'inhibiteur, que nous appellerons inhibiteur « mixte », a été conçu pour présenter une partie peptidique et une autre partie hétéroaromatique sur un châssis DCP. Le motif peptidique permettrait de reconnaître spécifiquement la cible biologique, et le motif hétéroaromatique pourrait agir comme élément perturbateur de la fibrillogénèse. Pour conjuguer ces deux biomolécules une double ligation chimiosélective est utilisée. L'assemblage 75 réalisé ici présente le dérivé du curcumin 57, lié par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I) dans le plan de son cycle, et deux peptides KLVFFA 38, liés par formation d'une oxime sur sa face supérieure (Fig. 76). Ce composé « mixte » est conçu pour cibler spécifiquement la fibrillation de l'Aβ₄₀. D'autres composés pourraient être synthétisés en utilisant la même stratégie avec les biomolécules présentées précédemment.

Dans un premier temps le châssis D6C-N₃/2Aoa-Boc 73 est synthétisé. Les fonctions oxyamines de ce châssis sont protégées par un groupement Boc. Au préalable, il est nécessaire de former l'ester activé NHS-Aoa-Boc²³³ 72 qui est ensuite couplé sur les fonctions amines de la D6C-N₃/2NH₂ 63 (Fig. 76). La D6C-N₃/2Aoa-Boc 73 est isolée avec un rendement de 67% après purification sur gel de silice.

II.3. Synthèse des assemblages pour le radiomarquage au technetium

Le châssis DCP peut également porter un élément de détection tel qu'un fluorophore, un chromophore ou un élément de radiomarquage dans le plan de son cycle (Fig. 77). Afin d'évaluer la pénétration cérébrale de nos composés chez la souris, des assemblages radiomarqués au ^{99m}Tc ont été synthétisés. Le complexe de cet élément radioactif dans nos assemblages est effectué par introduction d'une histidine sur l'amine de la chaîne alkyle dans le plan du cycle DCP (Fig. 99). Un kit commercial, le kit Isolink®, permet d'amener les ligands carbonylés nécessaires pour la formation du complexe de technétium avec l'histidine. La DCP peut porter un ou deux modules de reconnaissance. Ces derniers peuvent être comme précédemment des molécules hétéroaromatiques ou des séquences peptidiques. Les assemblages présentant un seul module de reconnaissance sont réalisés à partir d'une DCP correspondant à la condensation d'une lysine et d'une glycine (Fig. 77). Pour ceux portant deux modules de reconnaissance le châssis résulte de la condensation de deux lysines. Les motifs de reconnaissance ciblant la protéine tau et/ou le peptide A β sont les mêmes que ceux utilisés auparavant : l'ATPZ, les séquences KLVFFA (A β_{16-21}) et VQIVYK (tau $_{306-311}$). Il est nécessaire d'introduire une histidine dès la première étape de synthèse. En effet, celle-ci est protégée des groupes acido-labiles orthogonaux aux groupements Alloc des chaînes latérales des lysines du support. Après coupure du groupe Alloc, le châssis peut être soit directement couplé avec un module de reconnaissance portant une fonction acide carboxylique, soit fonctionnalisé pour introduire un module de reconnaissance par lien éther d'oxime.

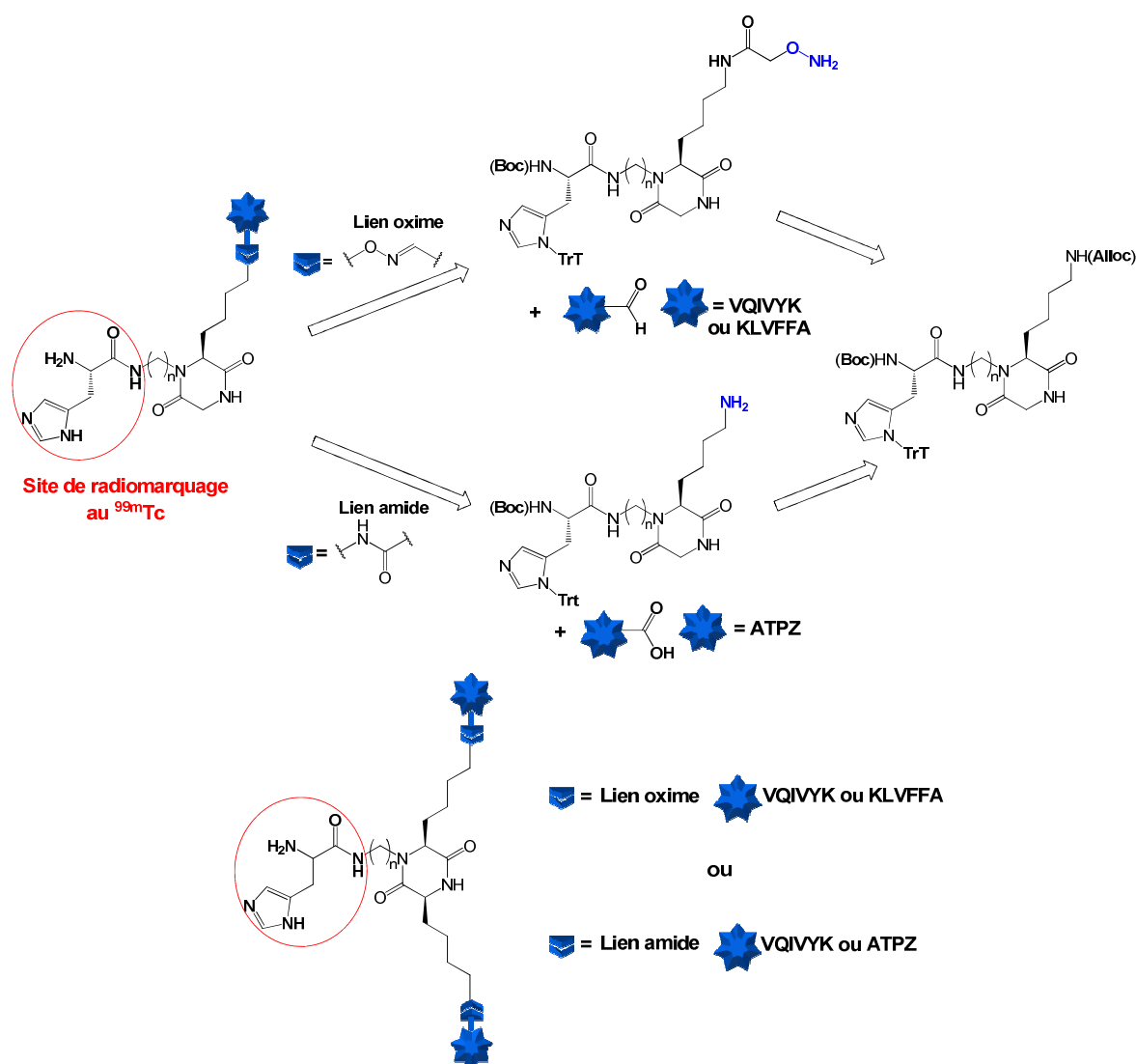


Fig. 77. Structure des assemblages pour le radiomarquage au ^{99m}Tc

II.3.1. Synthèse des molécules contrôles

Dans un premier temps des châssis DCP sans motif de reconnaissance ont été testés. Nous appellerons ces composés « DCP contrôles » (Fig. 78). Les châssis **78** et **79** DCP correspondent à la condensation de deux lysines dont l'amine des chaînes latérales est protégée par un groupement Alloc et possèdent une histidine dans le plan du cycle DCP. La différence entre ces deux DCP est la longueur de la chaîne aminoalkyle : à six carbones (D6C-His/2Alloc) ou à trois carbones (D3C-His/2Alloc). Nous avons pensé que la diminution de la longueur de cette chaîne permettrait de réduire la flexibilité de ce bras afin d'éviter les interactions avec les chaînes latérales des lysines. La troisième DCP contrôle **81** présente des chaînes latérales des lysines déprotégées (D3C-His/2NH₂). Les amines des chaînes latérales ont été laissées libres pour tester leur influence avec la méthode de marquage

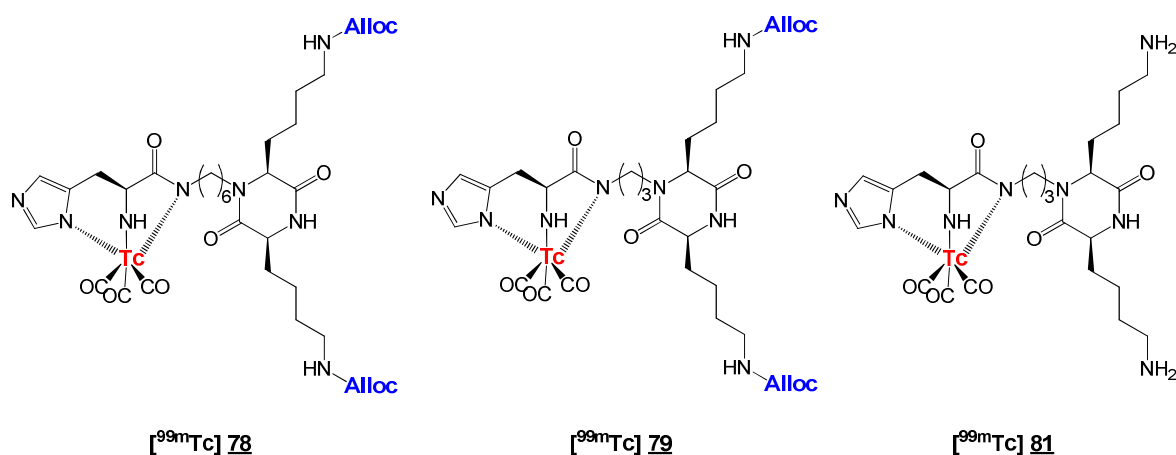
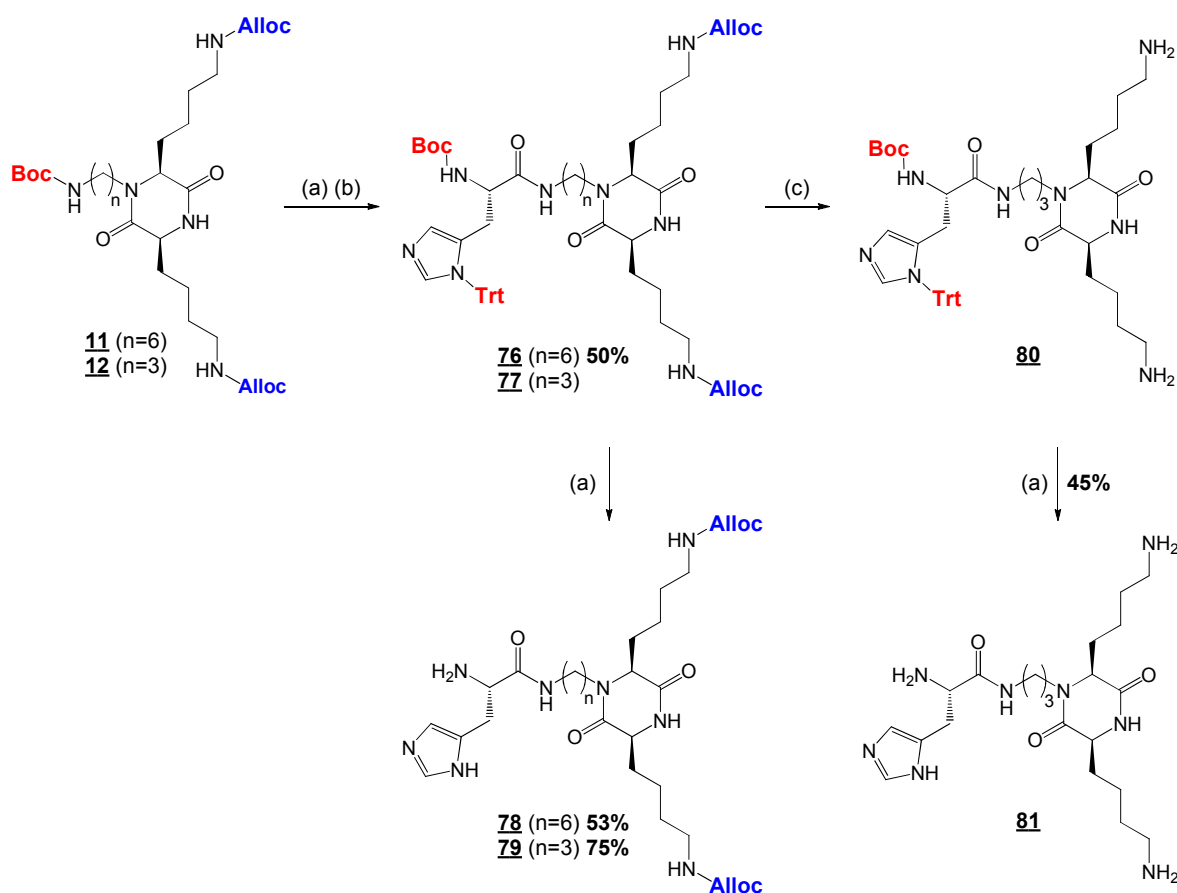


Fig. 78. Schéma des DCP contrôles radiomarquées

Les DCP contrôles **78** et **79** sont synthétisées à partir des châssis protégés **11** et **12** correspondants (Fig. 79). L'amine de la chaîne alkyle est déprotégée en milieu acide pour ensuite être couplée à la fonction acide de la (Boc)-His(Trt)-OH en présence de l'agent de couplage PyBOP et obtenir les D6C **76** et D3C **77**. Les D6C-His/2Alloc **78** et D3C-His/2Alloc **79** sont synthétisées après coupure des groupes protecteurs en milieu acide (50% TFA) et purification par CLHP préparative avec des rendements respectifs de 53 et 75%. Ces composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse.

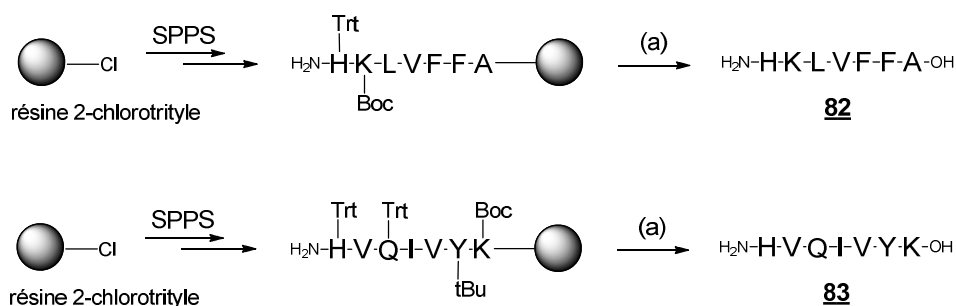
La troisième DCP contrôle, la D3C-His/2NH₂ **81**, est synthétisée par coupure des groupements Alloc de la D3C-(Boc)His(Trt)/2Alloc **77** en présence Pd(PPh₃)₄ (D3C-(Boc)His(Trt)/2NH₂ **80**, Fig. 79), puis coupure des groupements Boc et Trityle en milieu acide. La D3C-His/2NH₂ **81** est ainsi obtenue après purification par CLHP préparative avec un rendement de 45%. Le produit a été caractérisé en spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) TFA/DCM (1:1) (b) (Boc)His(Trt)-OH, PyBOP, DIEA, DCM (c) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM

Fig. 79. Synthèse des DCP contrôles

Les séquences peptidiques linéaires KLVFFA et VQIVYK (non couplées à la DCP) ont également été marquées au ^{99m}Tc *via* l'introduction d'une histidine en N-terminal pour servir de témoins (Fig. 80). Les peptides **82** et **83** sont classiquement synthétisés sur une résine 2-chlorotriyle par SPPS selon une stratégie Fmoc/tBu (Fig. 80).



Réactifs : (a) TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5)

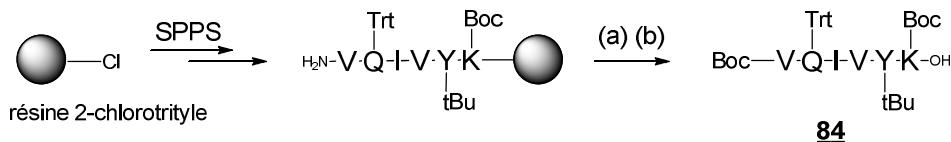
Fig. 80. Synthèse des peptides témoins 82 et 83

II.3.2. Synthèse des assemblages présentant des modules de reconnaissance

II.3.2.1. Assemblages peptidiques

A. Couplage des peptides par lien amide

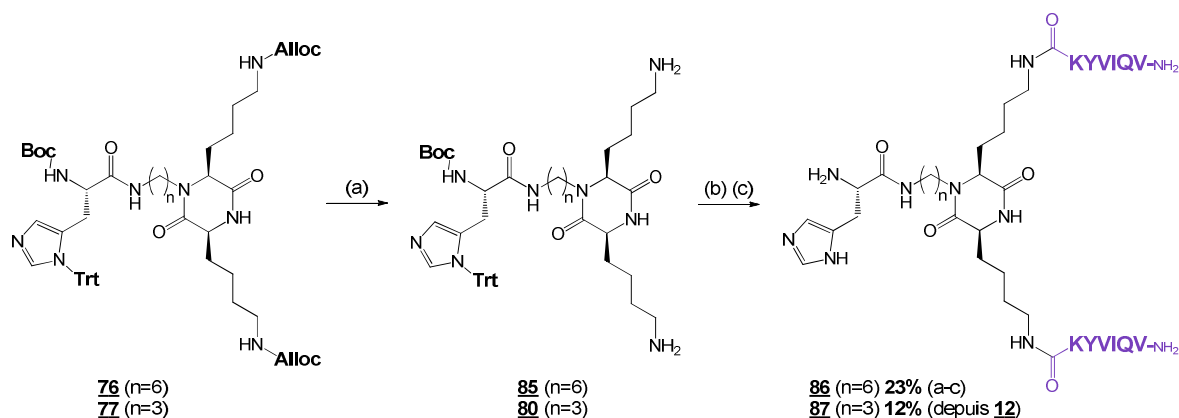
Dans un premier temps le peptide VQIVYK est couplé par son extrémité C-terminale par formation d'un lien amide sur les châssis D6C et D3C qui possèdent déjà une histidine sur leurs chaînes aminoalkyles. Ce couplage nécessite d'utiliser un agent de couplage et une séquence peptidique protégée. Un groupement protecteur Boc est donc introduit sur l'amine de l'extrémité N-terminale de la séquence VQIVYK en elongation sur un support 2-chlorotrityle (Fig. 81). Le peptide **84** est libéré du support en milieu légèrement acide (1% de TFA) afin de conserver les groupes protecteurs. Le peptide **84** est obtenu après précipitation dans l'éther, est caractérisé par CLHP et spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) Boc₂O, DCM, DIEA (b) TFA/DCM (1:99)

Fig. 81. Synthèse du peptide **84**

Le peptide **84** est couplé par sa fonction acide C-terminale sur les amines des D6C **85** et D3C **80** et (Fig. 82). La formation du lien amide est réalisé en milieu basique en présence de l'agent de couplage PyBOP. Après coupure des groupes protecteurs en milieu acide et purification par CLHP préparative, les assemblages D6C-His/2KYVIQV **86** et D3C-His/2KYVIQV **87** sont obtenus avec des rendements respectifs de 23 et 12%. Ces composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) $\text{Pd(PPh}_3)_4$, PhSiH_3 , DCM (b) 84, PyBOP, DIEA, DCM (c) TFA/DCM (1:1)

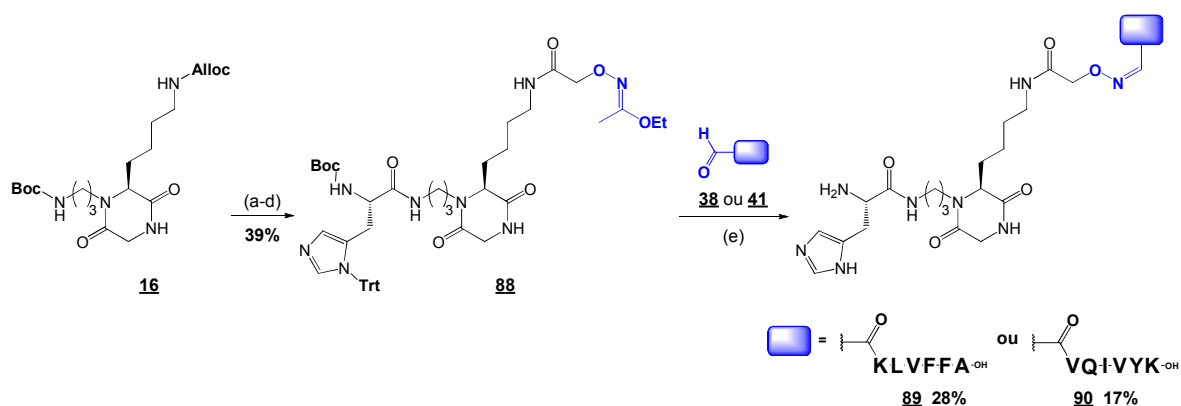
Fig. 82. Synthèse des D6C- et D3C-His/2KYVIQV 86 et 87

Le marquage des assemblages 86 et 87 au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ n'est pas spécifique. Nous avons supposé que cela pouvait être attribué à l'interaction des fonctions amines à l'extrémité N-terminale des séquences peptidiques. Nous avons donc par la suite couplé les séquences peptidiques par leur extrémité N-terminale (lien éther d'oxime).

B. Couplage des peptides par lien éther d'oxime

Les motifs de reconnaissance KLVFFA et VQIVYK sont ensuite couplés sur le châssis D3C par lien éther d'oxime. Un ou deux motifs peuvent être couplés en fonction du châssis utilisé (condensation de deux lysines ou d'une lysine et une glycine). Les D3C sont fonctionnalisées avec une ou deux fonctions oxyamines (protégées par un groupe acétimide) et sont ensuite couplées avec les peptides aldéhydes dont la synthèse a été décrite auparavant (paragraphe II.2.2.2).

La D3C-(Boc)His(Trt)/Acm (Acm pour acétimide) 88 est synthétisée à partir de la D3C-Boc/Alloc 16 (Fig. 83). L'amine de la chaîne latérale de cette dernière est libérée en milieu acide pour ensuite être couplée à la Boc-His(Trt)-OH en présence de l'agent de couplage PyBOP. Le groupe Alloc est coupé en présence de $\text{Pd(PPh}_3)_4$ pour donner la D3C-(Boc)His(Trt)/NH₂. La D3C-(Boc)His(Trt)/Acm 88 est synthétisée après couplage de l'ester activé 43 avec un rendement de 39%. Le produit a été caractérisé en spectrométrie de masse.



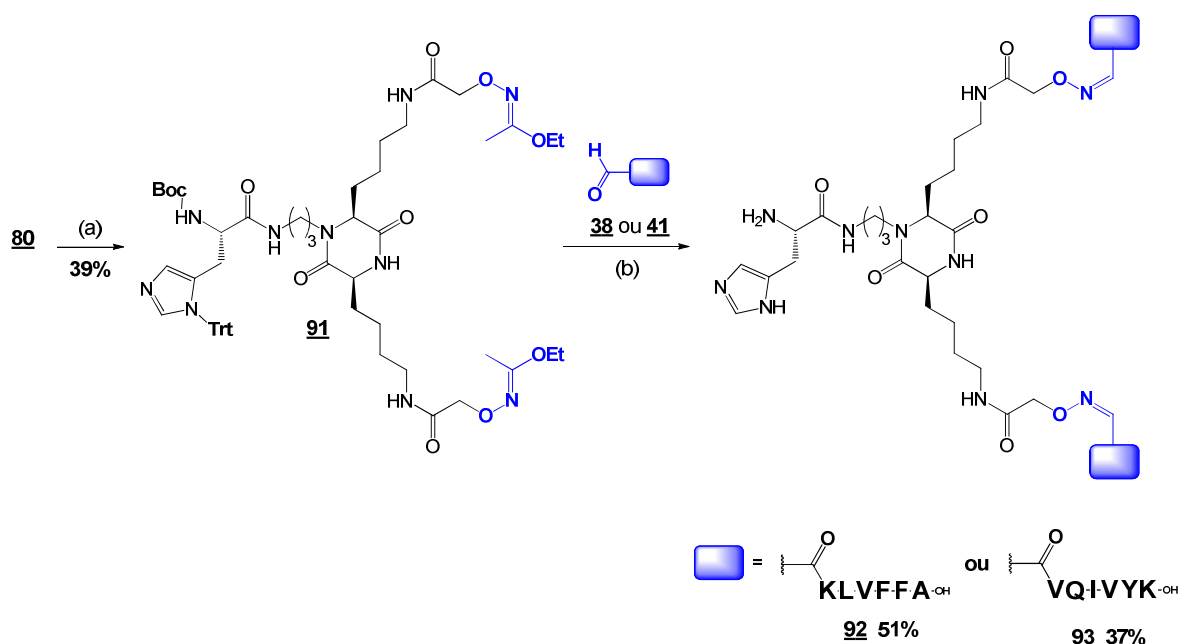
Réactifs : (a) TFA/DCM (1:1) (b) Boc-His(Trt)-OH, PyBOP, DIEA, DCM (c) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM (d) **43**, DIEA, DCM (e) **38** ou **41**, CH₃CN/H₂O/TFA (3:2:5), 37 °C

Fig. 83. Synthèse des D3C-His/KLVFFA **89 et D3C-His/VQIVYK **90****

Les séquences peptidiques **38** et **41** sont ensuite couplées sur le châssis D3C-(Boc)His(Trt)/Acm **88** par lien éther d'oxime (Fig. 83). Les D3C-His/KLVFFA **89** et D3C-His/VQIVYK **90** sont obtenues après purification par CLHP préparative avec des rendements respectifs de 28% et 17%. Les composés ont été caractérisés par spectrométrie de masse.

Pour introduire deux séquences peptidiques par lien éther d'oxime sur le châssis, la D3C-(Boc)His(Trt)/2Acm **91** est synthétisée par couplage de l'ester activé **43** avec les amines de la D3C-(Boc)His(Trt)/2NH₂ **80** (Fig. 84). La D3C-(Boc)His(Trt)/2Acm **91** est obtenue avec 39% de rendement après purification sur gel de silice. Le produit est caractérisé en spectrométrie de masse.

Les peptides **38** et **41** sont ensuite couplés sur la D3C-(Boc)His(Trt)/2Acm **91** en milieu acide fort (pH 1, 50% de TFA) afin de couper les groupes protecteurs simultanément à la formation du lien éther d'oxime. Les D3C-His/2KLVFFA **92** et D3C-His/2VQIVYK **93** sont obtenues après purification par CLHP préparative avec respectivement 51 et 37% de rendement. Ces assemblages sont caractérisés par spectrométrie de masse.

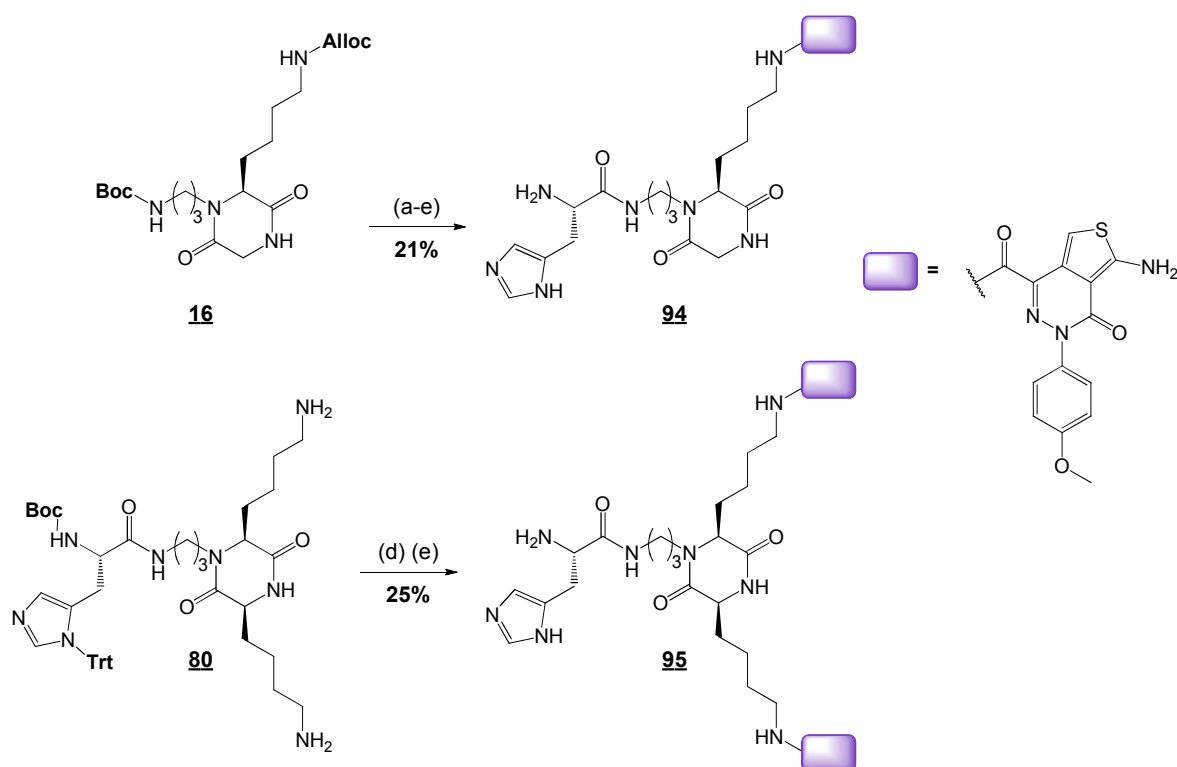


Réactifs : (a) **43**, DIEA, DCM (b) **38** ou **41**, CH₃CN/H₂O/TFA (3:2:5), 37 °C

Fig. 84. Synthèse des D3C-His/2KLVFFA **92 et D3C-His/2VQIVYK **93****

II.3.2.2. Assemblages présentant l'ATPZ

Un ou deux motifs de l'hétérocycle ATPZ sont couplés sur les châssis D3C portant déjà le module de radiomarquage (histidine) par lien amide (Fig. 85). La fonction acide de l'ATPZ est couplée avec la ou les fonctions amines des châssis D3C en présence de l'agent de couplage PyBOP. Le lien triazole n'est pas utilisé ici car nous avons observé qu'il interfère avec la méthode de radiomarquage (données non montrées). Les groupes protecteurs sont ensuite coupés en milieu acide fort (50% de TFA). Les produits bruts sont purifiés par CLHP préparative pour donner les D3C-His/ATPZ **94** et D3C-His/2ATPZ **95** avec des rendements respectifs de 21% et 25%. Les produits ont été caractérisés par spectrométrie de masse. Les faibles rendements obtenus pour les D3C **94** et **95** peuvent s'expliquer par la dégradation du cycle ATPZ en milieu acide fort. En effet, la formation d'un précipité est observée lors de cette étape.



Réactifs : (a) TFA/DCM (1:1) (b) Boc-His(Trt)-OH, PyBOP, DIEA, DCM (c) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM (d) ATPZ, PyBOP, DIEA, DMF (e) TFA/DCM (1:1)

Fig. 85. Synthèse des D3C-His/ATPZ 94 et de la D3C-His/2ATPZ 95

II.4. Evaluation biologique *in vitro* des inhibiteurs

Plusieurs méthodes sont utilisées pour caractériser la formation des fibres du peptide Aβ₄₀ et de la protéine tau. Elles comprennent des suivis de la fibrillation avec des colorants se liant spécifiquement aux feuillets β croisés (rouge Congo, ThT et ThS)^{3,4,48}, des études de microscopie (électronique ou à force atomique)^{5,18,41,56} et par diffusion de lumière²⁴⁴. Des études de toxicité du peptide Aβ₄₀ et de la protéine tau ont aussi été développées sur des cultures cellulaires^{245,211,223}. Toutes ces techniques sont également employées pour suivre l'effet de molécules potentiellement inhibitrices sur la fibrillation du peptide Aβ₄₀^{16,169,170} et de la protéine tau^{48,72,208}. Nous possédons au laboratoire des appareils permettant les études de suivi par fluorescence et par microscopie à force atomique (AFM). L'AFM permet de confirmer la formation des fibres et d'observer leurs morphologies.

244. Gamblin, T. C.; King, M. E.; Dawson, H.; Vitek, M. P.; Kuret, J.; Berry, R. W.; Binder, L. I., In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants. *Biochemistry* **2000**, 39 (20), 6136-6144.

245. Shearman, M. S.; Ragan, C. I.; Iversen, L. L., Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91 (4), 1470-1474.

Il a été établi que toutes les fibres amyloïdes possèdent la capacité de se lier à des colorants spécifiques des feuillets β croisés. En particulier l'émission de fluorescence de la ThT et de la ThS est déplacée vers 480 et 520 nm respectivement en présence de fibres amyloïdes^{4,48}. Cependant, le déplacement de fluorescence en présence de structures en feuillets β n'indique pas forcément une formation de fibres. Une étude par microscopie est donc nécessaire pour confirmer les résultats obtenus avec le suivi de fluorescence.

Le suivi par fluorescence avec la ThT ou la ThS de la fibrillation au cours du temps du peptide $A\beta_{40}$ ou de la protéine tau est une expérience de cinétique de fibrillation qui correspond à une courbe sigmoïde divisée en trois parties (Fig. 86) : une phase de latence nécessaire à la formation d'un noyau, une phase de croissance exponentielle (élongation des fibres à partir du noyau) et un plateau (équilibre thermodynamique entre les fibres et les espèces solubles).

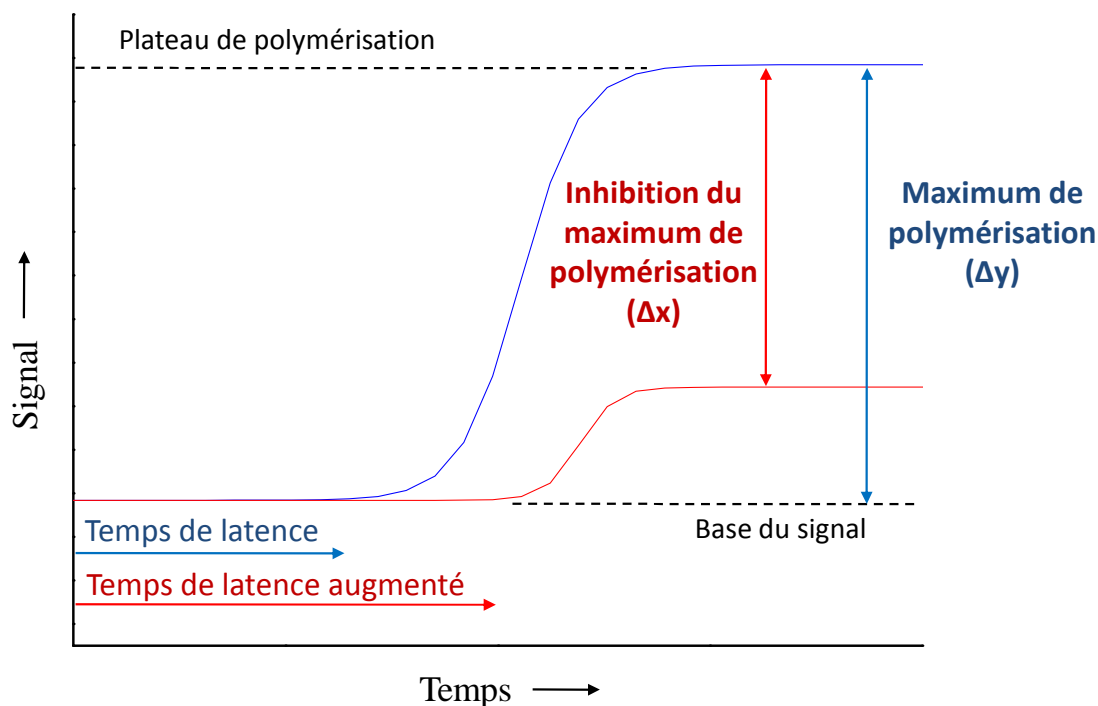


Fig. 86. Fibrillation *in vitro* du peptide $A\beta_{40}$: expérience de nucléation sans inhibiteur (bleu) ou avec inhibiteur (rouge)

L'ajout de composés inhibiteurs résulte soit en une augmentation du temps de latence (action sur la nucléation), soit en une diminution de l'intensité de la fluorescence (action sur la vitesse d'élongation et sur la quantité de fibres formées) comme le montre la Fig. 86. L'activité inhibitrice peut s'exprimer par le rapport des maximums de polymérisation en absence (Δy) et en présence d'inhibiteur (Δx). Plus le rapport ($\Delta x/\Delta y$) sera élevé, plus le composé possédera une activité inhibitrice importante. Ce rapport nous permet de calculer les pourcentages d'inhibition de nos composés.

Nous avons testé ici l'effet inhibiteur de nos composés sur la fibrillation du peptide $A\beta_{40}$. Le test de fibrillation du peptide $A\beta_{40}$ est réalisé dans du tampon phosphate (50 mM, pH 7,4 et 100 mM NaCl) en présence de ThT. Le fluorophore est introduit directement dans le milieu car cela permet de s'affranchir des erreurs de prélèvements d'aliquots. De plus, il a été montré que la ThT n'interfère pas avec la formation des fibres. Le peptide $A\beta_{40}$ a été synthétisé au laboratoire par synthèse automatisée et purifié par CLHP en phase inverse avec une colonne C5¹²⁹. Le test est réalisé dans des microplaques 96 puits et son principe est présenté dans le schéma ci-dessous (Fig. 87).

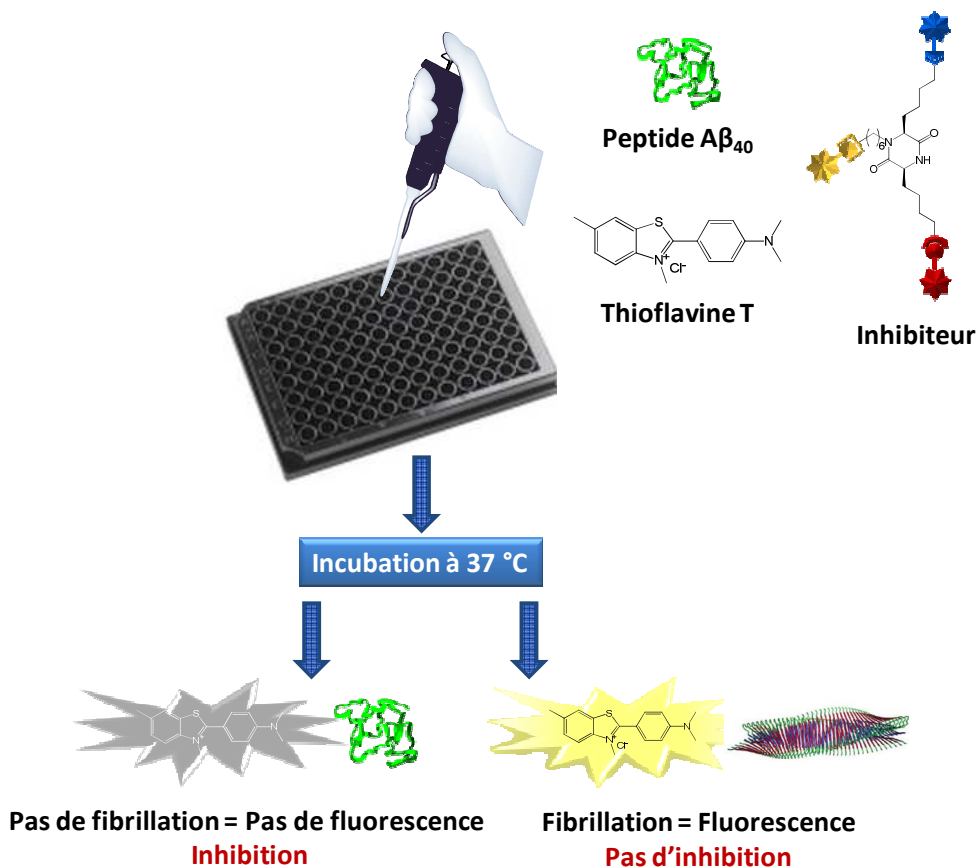


Fig. 87. Principe du test d'inhibition de la fibrillation du peptide $A\beta_{40}$ suivi par émission de fluorescence de la ThT

Les tests d'inhibition de la fibrillation de la protéine tau n'ont pas été effectués au cours de ces travaux. En effet, la protéine tau est exprimée en système bactérien et sa purification nécessite des techniques dont nous ne disposons pas actuellement au sein du laboratoire. Cependant, la collaboration avec l'équipe du Pr. Ghezzi (INSERM, UMR 1039) nous a permis d'accéder au matériel nécessaire. L'isoforme htau40 de la protéine a été obtenue récemment et les tests sont en cours.

II.4.1. Inhibiteurs peptidiques

II.4.1.1. Châssis dicétopiperazine

Dans un premier temps nous avons testé le pouvoir inhibiteur de châssis DCP sans motif de reconnaissance sur la fibrillation du peptide A β_{40} . L'évolution de la fluorescence de la ThT est tracée en fonction du temps. Les résultats obtenus pour la D6C-Alloc/2Boc **22** sont présentés ci-dessous (Fig. 88).

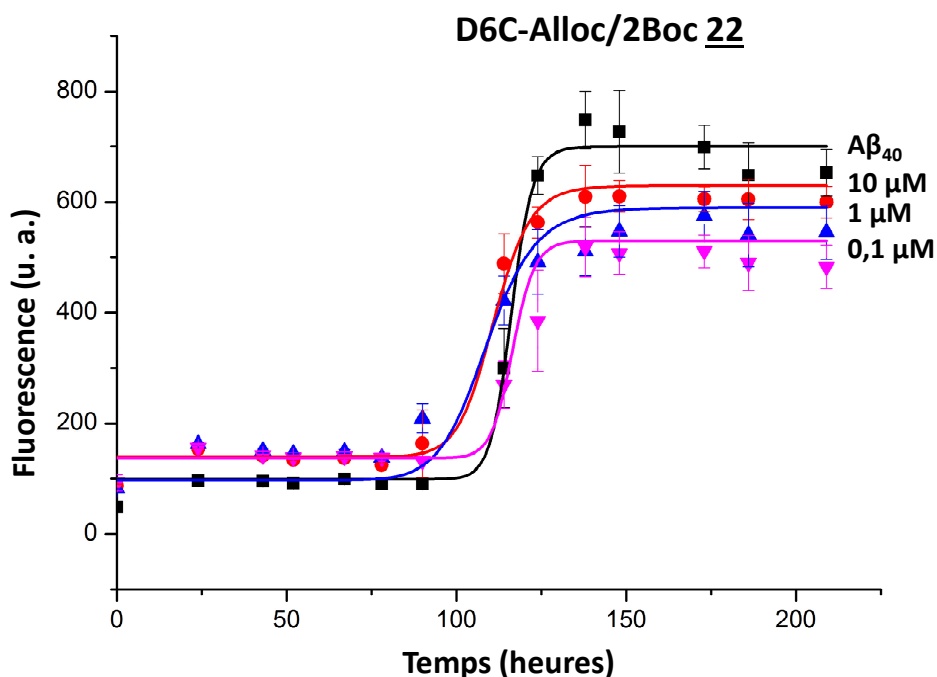


Fig. 88. Evolution de la fluorescence en fonction du temps avec la D6C-Alloc/2Boc **22**

L'évolution de la fluorescence pour quatre concentrations différentes du châssis D6C **22** en présence du peptide A β_{40} a été suivie au cours du temps. La fluorescence est diminuée de 22% pour une concentration de 10 μ M de D6C **22** (ratio 1:0,2 A β /D6C), ce qui indique que ce composé possède un faible pouvoir inhibiteur. Les résultats obtenus pour les châssis D6C **22**, **63** et **66** sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tabl. 8-).

Tabl. 8- Résultats obtenus avec les châssis sans motifs de reconnaissance

Composé I	D6C-Alloc/2Boc 22	D6C-N ₃ /2NH ₂ 63	D6C-NH ₂ /2N ₃ 66
Concentration	10 μ M	100 μ M	100 μ M
Rapport A β /I	1/0,2	1/2	1/2
% inhibition	22%	8%	5%

En présence de 100 μ M (ratio 1:2 A β /D6C) des châssis D6C N₃/2NH₂ **63** et D6C-NH₂/2N₃ **66**, le signal de fluorescence n'est quasiment pas affecté. Les châssis D6C ne

semblent pas avoir d'effet inhibiteur sur la fibrillation du peptide A β ₄₀ lorsqu'ils ne comportent pas de motif de reconnaissance d'après nos résultats.

II.4.1.2. Peptides couplés par leur extrémité C-terminale

Les D6C 32, 34 et 36, présentant respectivement un à trois motifs KLVFFA liés par leurs extrémités C-terminales ont été testés. Les cinétiques de fibrillation obtenues pour différentes concentrations de la D6C-NH₂/AFFVLK 34 sont présentées ci-dessous (Fig. 89).

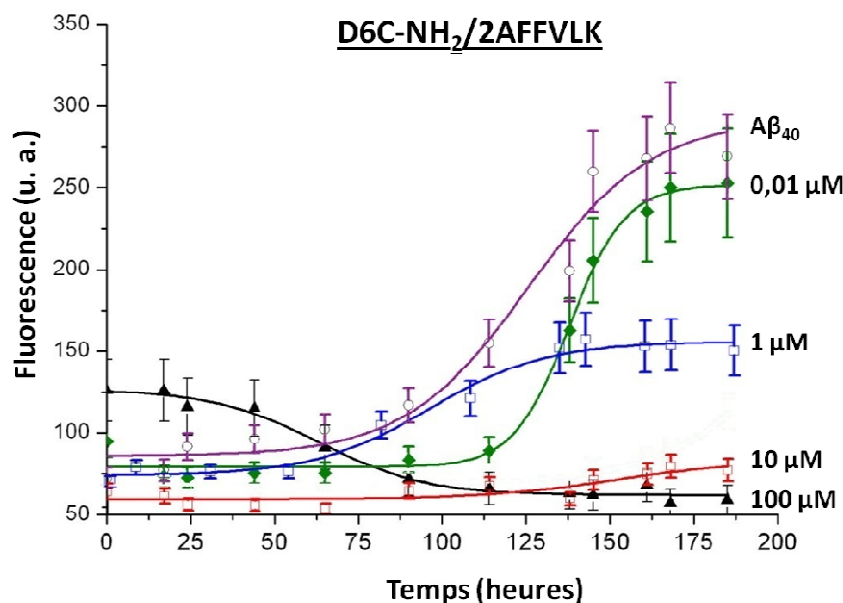


Fig. 89. Suivi de la fluorescence au cours du temps avec la D6C- NH₂/AFFVLK 34

Les courbes obtenues montrent une diminution du signal de fluorescence de 46% en présence de 1 μ M de D6C-NH₂/AFFVLK 34 (ratio 1:0,02 A β /D6C) et de 71% en présence de 10 μ M de D6C 34 (ratio 1:0,2 A β /D6C)

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les trois assemblages D6C présentant un à trois motifs KLVFFA liés par leurs extrémités C-terminales et le peptide linéaire de référence KLVFFA 30 (Tabl. 9-).

Tabl. 9- Résultats obtenus avec les D6C présentant les motifs KLVFFA liés par leurs C-ter

Composé I	D6C-AFFVLK/2Alloc <u>32</u>		D6C-NH ₂ /2AFFVLK <u>34</u>	D6C-3AFFVLK <u>36</u>		KLVFFA <u>30</u>
Concentration	1 μ M	10 μ M	1 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
Rapport A β /I	1/0,02	1/0,2	1/0,02	1/0,002	1/0,02	1/0,2
% inhibition	7%	61%	46%	55%	74%	20%

La présentation d'un motif KLVFFA sur le châssis D6C (D6C 32) résulte en une augmentation du pouvoir inhibiteur par rapport au peptide KLVFFA 30. Pour un même

rapport A β /I de 1:0,2, le pourcentage d'inhibition est multiplié par 3. La présentation de deux et trois motifs sur le châssis (D6C **34** et **36**) permet une meilleure inhibition pour un ratio de 1:0,02 A β /D6C (46 et 74% d'inhibition respectivement) par comparaison avec le peptide **30** pour un ratio plus élevé (20% d'inhibition pour un ratio 1:0,2 A β /**30**). La présentation de trois motifs KLVFFA permet d'obtenir une légère amélioration de l'activité d'inhibition que la présentation de deux : pour un ratio 1:0,02 A β /D6C **34** une inhibition de 46% est obtenue tandis que 55% d'inhibition est observée pour un ratio plus faible de 1:0,02 A β /D6C **36**. La présentation multimérique permet d'améliorer le pouvoir inhibiteur de nos composés dans cette étude.

Nous avons supposé que le sens de liaison (C-ter ou N-ter) du motif peptidique sur le châssis pouvait avoir une influence sur l'interaction des composés avec la cible. Les peptides liés sur le châssis D6C par leurs extrémités N-terminales et avec les fonctions amines du châssis D6C déprotégées ont donc été testés par la suite.

II.4.1.3. Peptides liés sur la D6C par leur extrémité N-terminale

Les D6C présentant un à trois motifs KLVFFA (A β ₁₆₋₂₀) ou VQIVYK (tau₃₀₆₋₃₁₁) ont été testées sur la fibrillation du peptide A β ₄₀. Les peptides seuls (KLVFFA **29** et VQIVYK **39**) servent de témoins.

Les résultats obtenus pour la D6C-NH₂/2KLVFFA **49** sont présentés ci-dessous (Fig. 90).

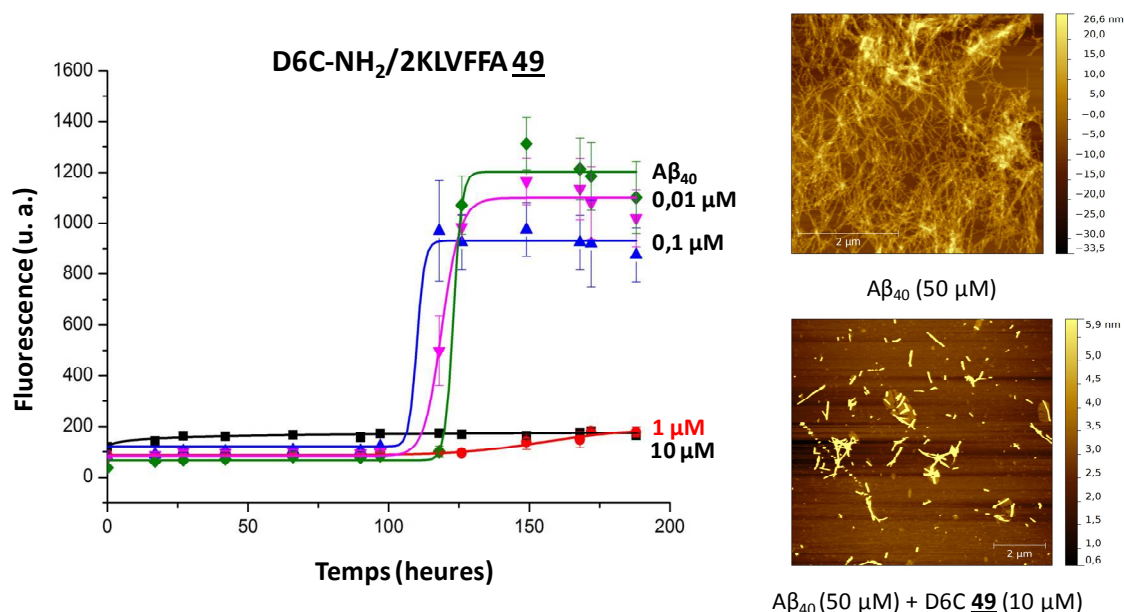


Fig. 90. A gauche : évolution de la fluorescence au cours du temps avec la D6C-NH₂/2KLVFFA **49**, A droite : Images du peptide A β ₄₀ par AFM sans (haut) ou avec 10 μ M de D6C **49** (bas) après 8 jours d'incubation à 37 °C

Pour les deux tests présentés, la D6C **49** inhibe quasiment la totalité la fibrillation du peptide A β ₄₀ pour un ratio 1:0,02 A β /D6C **49** (1 μ M). En microscopie à force atomique (AFM), le peptide A β ₄₀, après 8 jours d'incubation à 37 °C, forme un réseau de fibres dense. En présence de 10 μ M de D6C **49** (1:0,2 A β /D6C), peu de fibres sont observées. Celles-ci sont tronquées et éparses. Les résultats obtenus pour les composés présentant un à trois motifs KLVFFA sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tabl. 10-).

Tabl. 10- Résultats obtenus avec les D6C présentant le motif KLVFFA lié par son extrémité N-terminale

Composé I	D6C-KLVFFA/2NH ₂ 46	D6C-NH ₂ /2KLVFFA 49	D6C-3KLVFFA 52	KLVFFA 29
Concentration	1 μ M	1 μ M	1 μ M	10 μ M
Rapport A β /I	1/0,02	1/0,02	1/0,02	1/0,2
% inhibition	45%	82-89%	52-57%	20%

La présentation d'un seul motif KLVFFA sur le châssis D6C (D6C **46**) apporte une amélioration de l'activité inhibitrice. Une meilleure inhibition est obtenue pour un ratio dix plus fois faible qu'avec le peptide de référence KLVFFA **29** (45% pour un ratio 1:0,02 A β /D6C **46**). L'assemblage présentant deux peptides KLVFFA liés par leur extrémité N-terminale permet d'obtenir la meilleure inhibition. Pour une concentration de 1 μ M de D6C **49** (ratio 1:0,02 A β /D6C), une diminution du signal de 82 à 89% est observée dans les deux tests présentés. Le pouvoir inhibiteur lorsque deux motifs KLVFFA sont liés par leur extrémités N-terminales est donc amélioré par comparaison avec la D6C **34** où deux motifs sont liés en C-ter (46% d'inhibition pour un ratio 1:0,02 A β /D6C **34**, Tabl. 9-). L'introduction d'un troisième motif KLVFFA sur le châssis (D6C **52**) n'apporte pas de gain d'activité.

Les châssis **47**, **50** et **53** comportant respectivement un à trois motifs VQIVYK liés par leurs extrémités N-terminales, ont été testés. Le peptide **39** sert de référence. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tabl. 11-).

Tabl. 11- Résultats obtenus avec les D6C présentant le motif VQIVYK lié par son extrémité N-terminale

Composé I	D6C-VQIVYK/2NH ₂ 47	D6C-NH ₂ /2VQIVYK 50	D6C-3VQIVYK 53	VQIVYK 39
Concentration	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M
Rapport A β /I	1/0,02	1/0,02	1/0,02	1/0,02
% inhibition	28%	0%	15%	0%

Le peptide seul **39** ou présenté sur le châssis D6C (**47**, **50** et **53**) ne possède pas de pouvoir inhibiteur. Les pourcentages d'inhibition sont nuls ou très faibles. La séquence VQIVYK appartient à la séquence de la protéine tau et est supposée interagir

spécifiquement avec cette dernière. Ces résultats confirment donc la spécificité de cette séquence pour tau. L'utilisation de tous ces composés à une concentration de 10 μM résulte en une forte augmentation de l'intensité du signal (le même phénomène est observé avec la séquence KLVFFA pour des concentrations supérieures à 10 μM). Il est possible que les composés s'auto-associent ou que le peptide $\text{A}\beta_{40}$ s'agrège.

II.4.2. Inhibiteurs hétéroaromatiques

II.4.2.1. Assemblages curcumin

Dans un premier temps, le pouvoir inhibiteur des D6C présentant un (D6C 60) et deux motifs curcumin pyrazole (D6C 62) a été testé sur la fibrillation du peptide $\text{A}\beta_{40}$. Les groupes protecteurs des fonctions amines des châssis ont été conservés. Les résultats obtenus pour un test de fibrillation du peptide $\text{A}\beta_{40}$ en présence de la D6C-Boc/2CurcPyr 62 sont présentés ci-dessous (Fig. 91).

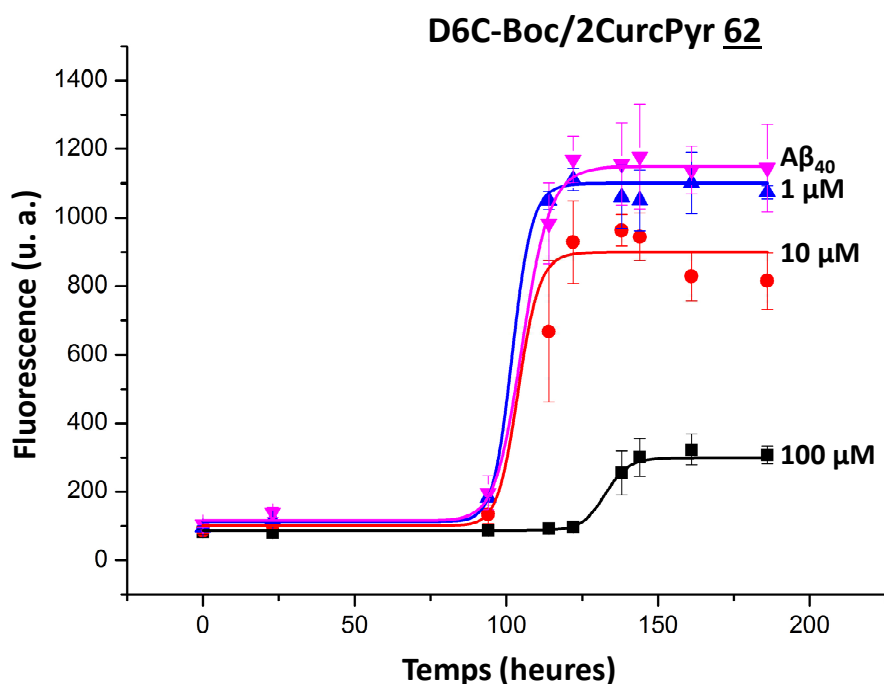


Fig. 91. Evolution de la fluorescence de la ThT au cours du temps avec la D6C-Boc/2CurcPyr 62

Les résultats obtenus pour les deux D6C (60 et 62) et le curcumin pyrazole de référence 56 sont indiqués dans le tableau ci-dessous (Tabl. 12-).

Tabl. 12- Résultats obtenus avec les D6C 60 et 62 présentant des motifs CurcPyr

Composé I	D6C-CurcPyr/2Alloc <u>60</u>		D6C-Boc/2CurcPyr <u>62</u>		CurcPyr <u>56</u>		Curcumin	
Concentration	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
Rapports A β /I	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2
% inhibition	23%	45%	20%	74%	0%	74%	54%	80%

Dans la littérature¹⁹⁵, le curcumin modifié par un cycle pyrazole inhibe préférentiellement la fibrillation de la protéine tau (avec des IC₅₀ inférieures à 1 μ M) à celle du peptide A β (IC₅₀ supérieures à 1 μ M mais elles n'ont pas été déterminées précisément), tandis que le curcumin seul possède une IC₅₀ de 0,19 μ M¹⁹². Le pouvoir inhibiteur obtenu dans nos tests pour le curcumin est plus faible que celui obtenu dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes. Notre curcumin modifié par un cycle pyrazole 56 est un moins bon inhibiteur de la fibrillation du peptide A β que le curcumin non modifié. Pour un ratio 1:0,2 A β /composé, le curcumin modifié 56 n'inhibe pas la fibrillation alors que le curcumin provoque 54% d'inhibition.

La présentation d'un ou deux motifs curcumin pyrazole sur le châssis D6C n'entraîne pas de réelle amélioration du pouvoir inhibiteur.

Dans un second temps, les fonctions amines des châssis ont été déprotégées afin d'augmenter la solubilité des produits. Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus pour les différents assemblages D6C 64 et 67 présentant respectivement un et deux motifs curcumin pyrazole (Tabl. 13-).

Tabl. 13- Résultats obtenus avec les D6C présentant des motifs CurcPyr 64 et 67

Composé I	D6C-CurcPyr/2NH ₂ <u>64</u>		D6C-NH ₂ /2CurcPyr <u>67</u>		CurcPyr <u>56</u>		Curcumin	
Concentration	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
Rapports A β /I	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2
% inhibition	50%	91%	63%	72%	0%	74%	54%	80%

Les châssis déprotégés D6C 64 et 67 présentant un et deux motifs curcumin pyrazole, possèdent un meilleur pouvoir inhibiteur que leurs homologues comportant des groupes protecteurs : les D6C 64 et 67 inhibent respectivement 50 et 60% la fibrillation du peptide A β ₄₀ pour un ratio 1:0,2 A β /D6C tandis que leurs homologues protégés inhibent seulement environ 20% de la fibrillation pour le même ratio (Tabl. 13-). La présentation du motif curcumin pyrazole sur le châssis déprotégé entraîne donc une amélioration du pouvoir inhibiteur par rapport au composé de référence 56, qui n'inhibe pas pour un ratio comparable. Néanmoins leur pouvoir inhibiteur n'est pas amélioré par rapport au curcumin qui présente pour un même ratio un pourcentage équivalent de 54%. De plus,

comme pour le châssis protégé, la présentation mutimérique n'apporte pas ici une réelle amélioration du pouvoir inhibiteur.

Les châssis présentant un ou deux motifs curcumin liés via une fonction alcyne sur les châssis ont été testés. Les résultats pour un test de fibrillation du peptide A β ₄₀ en présence de la D6C-NH₂/2Curc **68** sont présentés ci-dessous (Fig. 92).

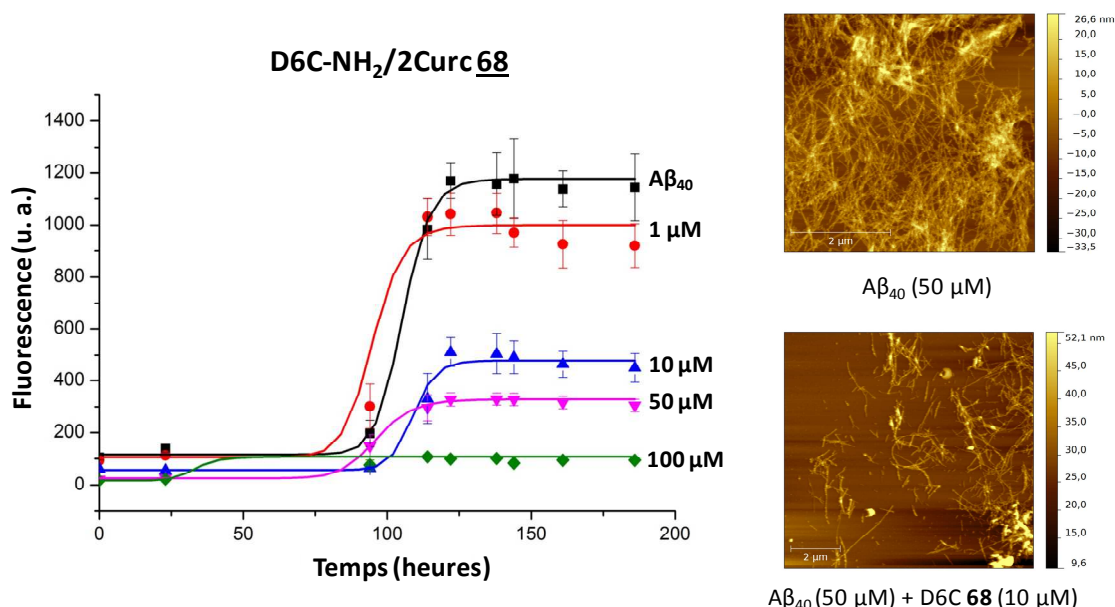


Fig. 92. A gauche : évolution de la fluorescence au cours du temps avec la D6C-NH₂/2Curc **68**, A droite: Images du peptide A β ₄₀ par AFM sans (haut) ou avec 10 μ M de D6C **68** (bas) après 8 jours d'incubation à 37 °C

La D6C-NH₂/2Curc **68** permet d'inhiber la totalité de la fibrillation du peptide A β ₄₀ pour un ratio 1:2 (A β /D6C) et 66% de la fibrillation pour un ratio 1:0,2 (A β /D6C). En présence de 10 μ M de D6C **68** (1:0,2 A β /D6C), un nombre de fibres moins important qu'en l'absence du composé est observé en AFM. Celles-ci sont plus éparses et plus courtes qu'en absence d'inhibiteur. Le tableau ci-dessous (Tabl. 14-) présente les résultats obtenus pour les D6C **65** et **68** présentant respectivement un et deux motifs curcumin.

Tabl. 14- Résultats obtenus avec les D6C **65 et **68** présentant des motifs curcumin**

Composé I	D6C-Curc/2NH ₂ 65		D6C-NH ₂ /2Curc 68		Curc 57		Curcumin	
Concentration	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
Rapports A β /I	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2
% inhibition	55%	93%	66%	90%	40%	72%	54%	80%

L'activité des composés **65** et **68** est sensiblement la même que celle obtenue avec les composés présentant le motif curcumin pyrazole (composés **64** et **67**, Tabl. 13-) ainsi

qu'avec le curcumin alcyne **57** de référence ou le curcumin non modifié. De nouveau la présentation multimérique n'apporte pas une amélioration du pouvoir inhibiteur.

II.4.2.2. Assemblages ATPZ

Les D6C **70** et **71** présentant respectivement un et deux motifs ATPZ ont été testées. Les résultats obtenus pour un test d'inhibition de la fibrillation du peptide A β ₄₀ en présence de la D6C-NH₂/2ATPZ **71** sont présentés ci-dessous (Fig. 93).

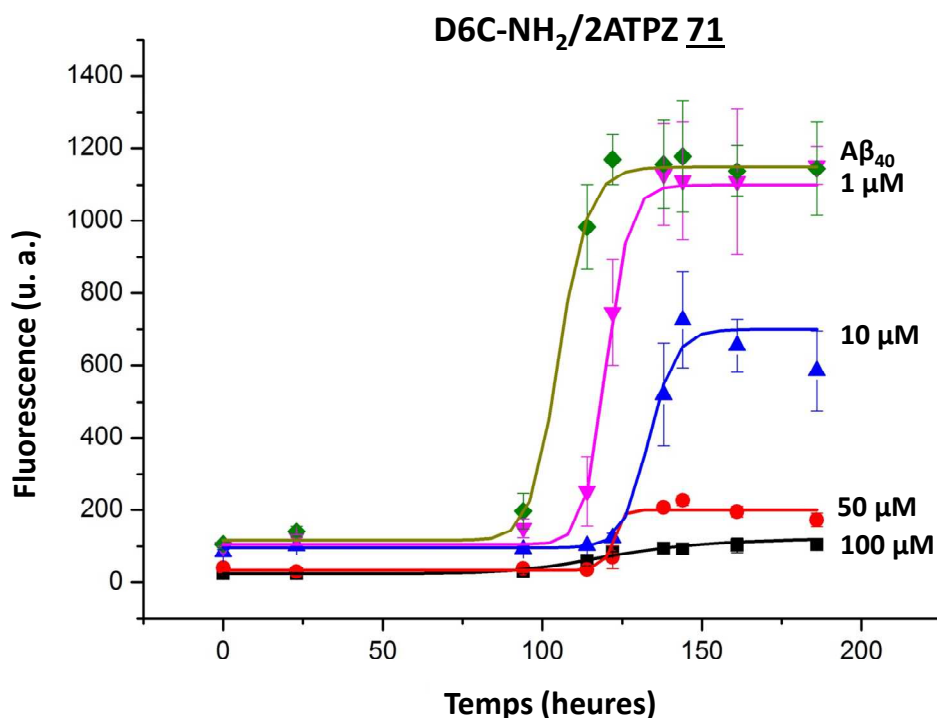


Fig. 93. Evolution de la fluorescence au cours du temps en présence de la D6C **71**

Les résultats obtenus pour les D6C **70**, **71** et l'ATPZ alcyne **69** de référence sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tabl. 15-).

Tabl. 15- Résultats obtenus avec les D6C présentant l'ATPZ

Composé I	D6C-ATPZ/2NH ₂ 70		D6C-NH ₂ /2ATPZ 71		ATPZ 69
Concentration	10 µM	100 µM	10 µM	100 µM	100 µM
Rapports A β /I	1/0,2	1/2	1/0,2	1/2	1/2
% inhibition	53%	84%	40%	90%	24%

Le composé de référence possède un faible pouvoir inhibiteur de la fibrillation du peptide A β ₄₀ (24% d'inhibition pour un ratio 1:2 A β /**69**), ce qui correspond à ce qui est décrit dans la littérature^{217,218}. L'introduction du motif ATPZ sur le châssis D6C entraîne une augmentation significative du pouvoir inhibiteur de la fibrillation du peptide A β ₄₀ par rapport à l'ATPZ seule **69**. Pour le ratio 1:2 A β /D6C plus de 80% d'inhibition sont obtenus

en présence des deux composés et pour un ratio 1:0,2 une inhibition entre 40 et 50% est observée. En revanche la présentation de deux motifs sur le châssis n'apporte pas d'amélioration par rapport à la présentation d'un seul.

Le châssis pourrait dans ce cas permettre une meilleure solubilité du ou des motifs ATPZ *via* les fonctions amines libres des sites non fonctionnalisés, ce qui pourrait permettre d'expliquer que le composé présentant un seul motif **70** (et donc deux fonctions amines libres) ait un pouvoir inhibiteur légèrement supérieur à celui possédant deux motifs ATPZ **71** (et par conséquent une seule fonction amine).

II.4.2.3. Inhibiteur mixte

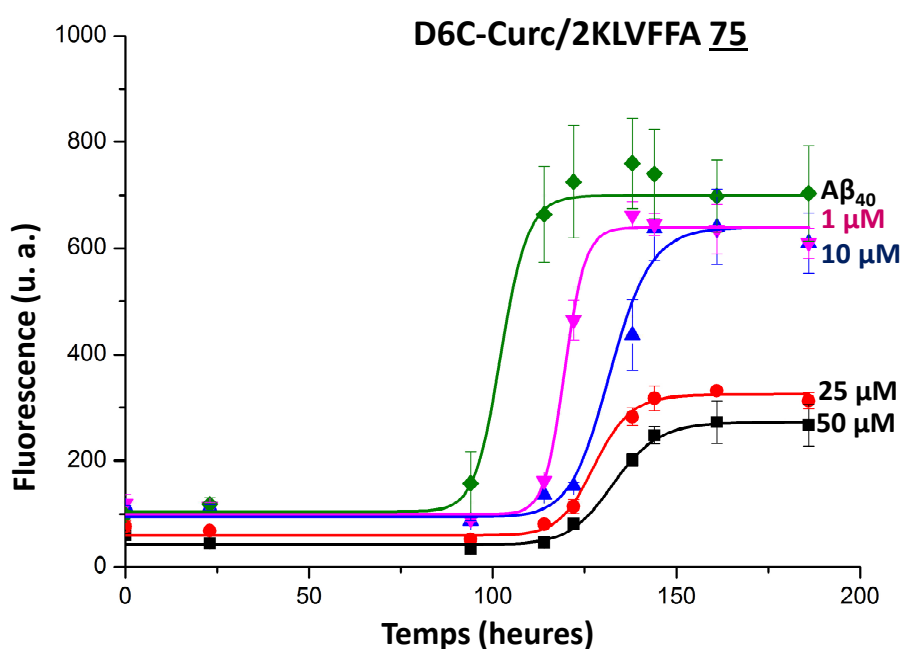


Fig. 94. Evolution de la fluorescence en fonction du temps avec la D6C 75

La D6C **75** présentant un motif curcumin (élément perturbateur de la fibrillation) et deux motifs KLVFFA (éléments de reconnaissance et perturbateurs) a été testée (Fig. 94). Une diminution du signal de fluorescence de 44% est observée pour un ratio 1:0,5 Aβ/D6C **75** et aucune inhibition n'est obtenue pour un ratio 1:0,2 Aβ/D6C **75**. Le pouvoir inhibiteur est bien moindre que celui observé avec le curcumin (54% d'inhibition pour un ratio 1:0,2 Aβ/Curc), et surtout que celui obtenu avec la D6C **49** présentant deux motifs KLVFFA (plus de 80% d'inhibition pour un ratio 1:0,02 Aβ/D6C). Ce résultat pourrait être attribué à une mauvaise solubilité du produit ou à l'inefficacité du composé « mixte ».

II.4.2.4. Synthèse des résultats

Les résultats obtenus pour les composés présentant des motifs peptidiques sont synthétisés ci-dessous sous forme d'histogramme (Fig. 95).

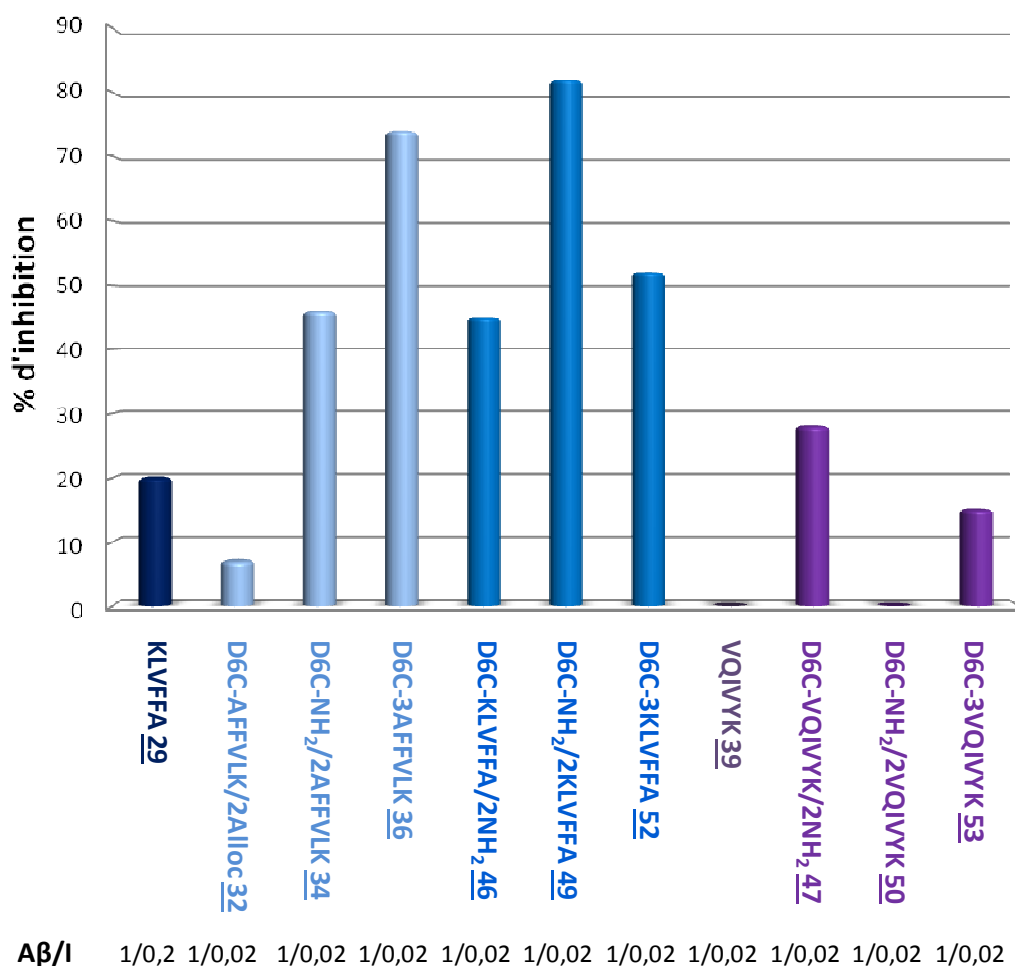


Fig. 95. Pourcentages d'inhibition de la fibrillation du peptide Aβ₄₀ obtenus avec les assemblages présentant des motifs peptidiques

La présentation multimérique de plusieurs motifs KLVFFA sur le châssis D6C permet d'obtenir un meilleur pouvoir inhibiteur que celui observé avec le peptide KLVFFA de référence et ceci pour des ratio dix fois moindre Aβ/composé. Dans la littérature, le peptide Ac-QKLFF-NH₂ n'inhibe pas la fibrillation du peptide Aβ₄₀ pour un ratio 1:2 Aβ/peptide¹⁶⁵. La D6C présentant deux motifs KLVFFA liés par leur extrémité N-terminale (D6C 49) possède un meilleur pouvoir inhibiteur que la D6C possédant deux de ces motifs liés par leur extrémité C-terminale (D6C 34). Cela n'est pas vérifié, et la tendance est même inversée, pour les composés présentant trois motifs KLVFFA 36 et 52. Ces résultats semblent montrer que le sens de ligation a peu d'impact sur le pouvoir inhibiteur.

Dans la littérature, le composé tétramérique sur lequel sont greffés des motifs KLVFFA inhibe 25% de la fibrillation du peptide $A\beta_{42}$ pour un ratio 1:0,2 $A\beta$ /tétramère et 60% de sa fibrillation pour un ratio 1:1 $A\beta$ /tétramère²²⁶. Le cyclodécapeptide présentant deux motifs KLVFFA, utilisé lors de travaux antérieurs au sein du laboratoire, inhibe 90% de la fibrillation du peptide $A\beta_{40}$ pour un ratio 1/0,02 $A\beta$ /inhibiteur^{130,132}. Nos composés présentant deux motifs KLVFFA **34** et **49** inhibent respectivement 46% et plus de 80% de la fibrillation du peptide $A\beta_{40}$ pour un ratio 1:0,2 $A\beta$ /D6C. Ainsi nos composés semblent plus efficaces que le tétramère décrit dans la littérature²²⁶, mais il est difficile de comparer car le tétramère a été testé sur le peptide $A\beta_{42}$. La D6C **49** (deux motifs KLVFFA liés par leur N-ter) est le composé présentant la meilleure activité inhibitrice et celle-ci est comparable à celle du cyclodécapeptide présentant deux motifs KLVFFA^{130,132}. Les D6C présentant un à trois motifs VQIVYK (D6C **47**, **50** et **53**) ainsi que le peptide de référence VQIVYK **39** n'inhibent pas la fibrillation du peptide $A\beta_{40}$. Ceci semble démontrer une spécificité de la séquence KLVFFA pour cibler le peptide $A\beta_{40}$.

Pour les composés présentant des molécules hétéroaromatiques (Fig. 96) aucun effet de la multimérisation n'est observé contrairement aux composés peptidiques. En effet, les activités sont quasiment les mêmes avec un seul motif ou deux présentés sur le châssis DCP (D6C **64/67**, **65/68**, **70/71**).

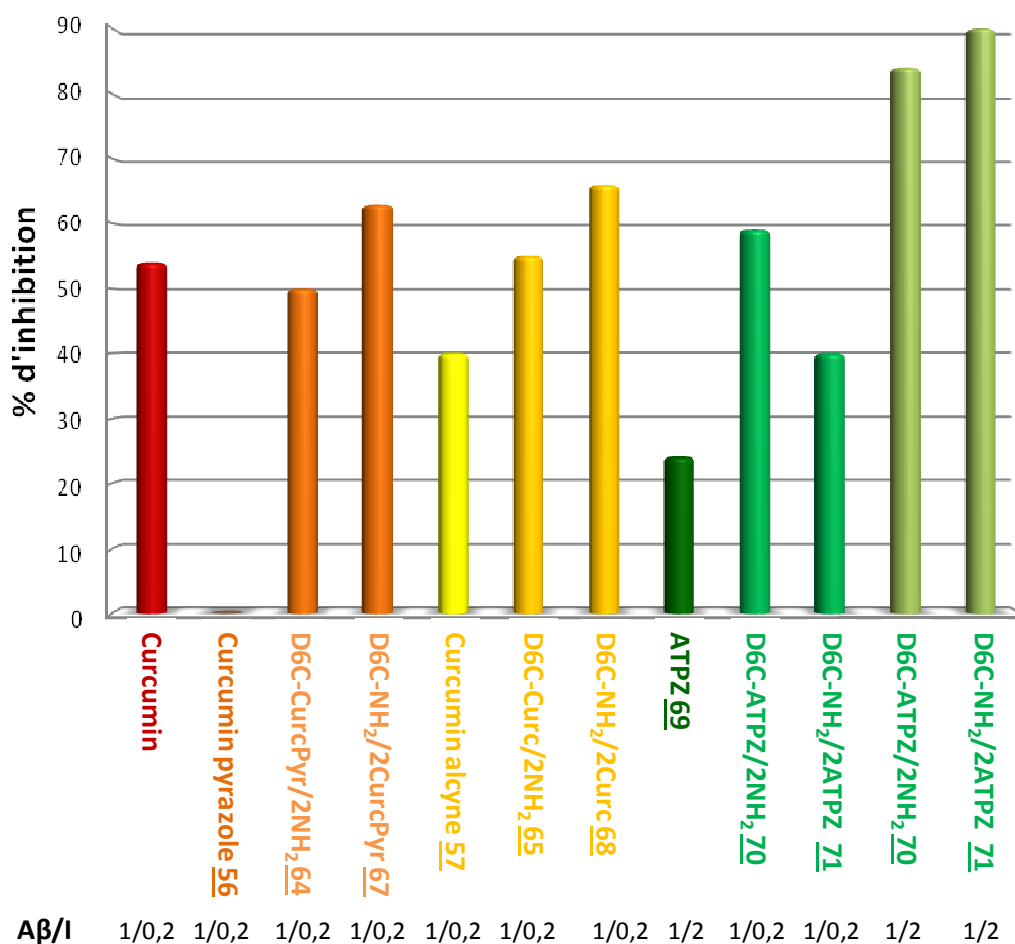


Fig. 96. Pourcentages d'inhibition de la fibrillation du peptide Aβ₄₀ obtenus avec les assemblages présentant des molécules hétéroaromatiques.

La DCP présentant des motifs curcumin (liés par le cycle phénolique ou par un cycle pyrazole) ont une activité comparable à celle du curcumin, connu pour être un inhibiteur de la fibrillation du peptide Aβ. Néanmoins la présentation multimérique de ce motif n'apporte aucun avantage par rapport à l'utilisation du curcumin seul. Le cyclodécapeptide présentant deux motifs curcumin greffés par lien triazole permet d'inhiber 60 à 80% de la fibrillation du peptide Aβ₄₀ pour un ratio 1:0,08 Aβ/inhibiteur^{130,132}. Nos composés sont donc moins efficaces que ce dernier. Le cyclodécapeptide est un gabarit possédant un poids moléculaire, supérieur à celui de la DCP et peut par conséquent jouer le rôle d'un élément perturbateur de la fibrillation du peptide Aβ₄₀. Par ailleurs, ce châssis présente deux résidus arginines sur une de ses faces qui peuvent également interférer avec la fibrillation. Ceci pourrait expliquer la différence d'activité de nos composés avec ceux réalisés à partir du gabarit cyclodécapeptide.

Pour les DCP présentant des motifs ATPZ, leur activité inhibitrice est comparable à celle du curcumin seul et donc des DCP curcumin. On note par contre contrairement aux DCP curcumin, l'intérêt de la présentation du motif ATZ en surface du châssis. En effet, les

assemblages présentant un ou deux motifs ATPZ sur le châssis (D6C **70** et **71**) permettent d'obtenir une inhibition de l'ordre de 50% de la fibrillation du peptide A β ₄₀ pour un ratio 1:0,2 A β /D6C alors que l'ATPZ de référence **69** n'inhibe pas la fibrillation.

Pour la présentation multimérique des motifs aromatiques testés, le châssis DCP semble moins adapté que le châssis cyclodécapeptidique, utilisé lors de travaux précédents. Mais ce châssis a été utilisé pour son potentiel, contrairement au décapeptide, en tant que transporteur pour faciliter le passage de composés actifs à travers la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, bien que certaines D6C présentant des composés hétéroaromatiques ne possèdent pas une meilleure activité inhibitrice que les composés de référence, l'activité est tout de même conservée. L'utilisation du châssis D6C pourrait favoriser la pénétration cérébrale des molécules hétéroaromatiques sans perte de leur activité biologique.

II.5. Evaluation biologique *in vivo* des assemblages radiomarqués au ^{99m}Tc

Afin d'évaluer nos composés *in vivo* dans des modèles de souris, les assemblages possédant une histidine sont marqués au ^{99m}Tc. Des expériences d'analyse sur coupes de cerveaux (i) après injection périphérique du radiotraceurs (*ex vivo*) ou (ii) après exposition des coupes au composés marqués au ^{99m}Tc (*in vitro*) permettent de visualiser la cible des composés (plaques amyloïdes vs DNF). Ces expérimentations ont été effectuées en collaboration avec l'équipe du Pr. Ghezzi (INSERM, UMR 1039). Cette équipe est spécialisée dans le développement de radiomarqueurs pharmaceutiques. Dans une première partie des radiotraceurs des plaques amyloïdes et des DNF décrits dans la littérature ainsi que les différents modèles de souris transgéniques existants seront présentés. Dans une seconde partie nous décrirons le radiomarquage des assemblages au ^{99m}Tc. Enfin, dans une dernière partie, les résultats d'imagerie obtenus chez la souris seront détaillés.

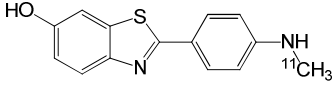
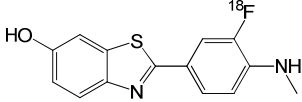
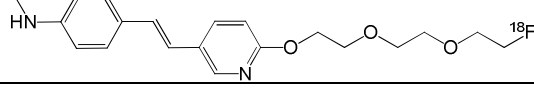
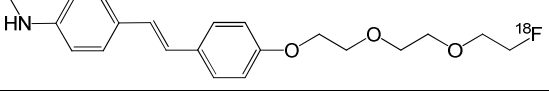
II.5.1. Etat de l'art sur les outils pour l'étude des plaques amyloïdes et des DNF *in vivo*

II.5.1.1. Radiotraceurs référencés pour les plaques amyloïdes et les DNF

L'imagerie nucléaire est une technique permettant de détecter les deux types de lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : les plaques amyloïdes et les DNF. L'imagerie nucléaire la plus utilisée est la TEP (Tomographie par émission de positons).

Bien que de nombreux radiotraceurs soient décrits pour cibler les plaques amyloïdes, quatre molécules se distinguent : le ^{11}C -PiB, le ^{18}F -Florbetapir, le ^{18}F -Flutemetamol et le ^{18}F -Florbetapen (Tabl. 16-)^{115,118,246}.

Tabl. 16- Marqueurs des peptides A β en imagerie TEP

Composé	Structure	Groupe chimique	Isotope utilisé	Affinité pour l'amyloïde (K _i , nM)
Pittsburgh Compound B (PiB)		Benzothiazole	^{11}C	0,9
Flutemetamol (GE-067 ou 3'-fluoro-PiB)		Benzothiazole	^{18}F	0,7
Florbetapir (AV-45)		Styrylpyridine	^{18}F	2,2
Florbetapen (BAY-94-9172 ou AV-1)		Stilbène	^{18}F	2,4

Le ^{11}C -PiB (Pittsburgh Compound B) est le radiotraceur des peptides amyloïdes le plus utilisé^{115,117,118,246}. Les études d'imagerie effectuées avec cette molécule montrent une répartition cérébrale des plaques amyloïdes correspondant à une atteinte du cortex préfrontal, de la région tempo-pariétale et du cortex cingulaire postérieur. L'hippocampe et le cortex occipital ne sont pas ou peu marqués. La majorité des patients chez qui la maladie d'Alzheimer a été diagnostiquée en clinique ou *post mortem* présentent un profil ^{11}C -PiB positif (fixation importante dans le néocortex). Les données actuelles ne permettent pas de savoir si ce profil, quand il est observé chez des patients non déments, s'accompagne systématiquement d'une conversion plus ou moins rapide vers la démence. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la sensibilité et la spécificité du ^{11}C -PiB pour suivre l'évolution de la pathologie. Des études ont montré que 96% de 341 patients diagnostiqués cliniquement atteints de la maladie d'Alzheimer et 24% de 651 personnes âgées cognitivement normales présentent des profils positifs avec le ^{11}C -PiB¹¹⁷. Il semblerait toutefois que les sujets présentant des troubles cognitifs et un profil ^{11}C -PiB positif ont un risque élevé de développer une démence. Ce profil positif serait également un bon outil diagnostique pour distinguer la maladie d'Alzheimer des démences fronto-temporales (non liées à des dépôts amyloïdes).

²⁴⁶ 246.Herholz, K.; Ebmeier, K., Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **2011**, 10 (7), 667-670.

Cependant plusieurs limitations sont associées à l'utilisation de ce radiotraceur. La mesure de sa rétention dans le cerveau atteint un plateau relativement tôt au cours du développement de la pathologie ce qui empêche de suivre ce qui se passe dans les phases ultérieures de la maladie. De plus, des sujets non déments d'après le diagnostic clinique mais possédant un profil ^{11}C -PiB positif, ont été observés. Enfin, l'isotope radioactif ^{11}C est peu disponible (nécessite un cyclotron à proximité), possède une durée de demi-vie courte (20 min) et son coût est important. C'est pour cela que des molécules marquées avec le radioisotope ^{18}F ont été développées (Tabl. 16-)²⁴⁶. Ce dernier est également produit au cyclotron mais possède une durée demi-vie de 110 min (peut être transporté). Les trois traceurs Flutemetamol, Florbetapen et Florbetapir ont des affinités de liaison au peptide amyloïde similaires à celle obtenue avec le ^{11}C -PiB. Par exemple, le Flutemetamol est l'analogue fluoré du ^{11}C -PiB. Il présente des propriétés de fixation similaires à celle observées avec son analogue ^{11}C , en particulier une bonne corrélation est obtenue dans les zones corticales. La sensibilité et la spécificité de ce traceur sont estimées toutes deux à 93%. Un grand nombre de traceurs de l'amyloïde permettent de mettre en évidence le taux d'amyloïde présent dans le cerveau rapidement. Les profils obtenus présentent une bonne corrélation avec l'anatomo-pathologie.

L'imagerie de la protéine tau est encore peu développée. La détection des DNF est essentielle car il semblerait que les symptômes cliniques corréleraient davantage à leur répartition qu'avec celle des dépôts amyloïdes. La détection de la protéine tau pourrait aussi permettre d'effectuer un diagnostic plus précoce de la maladie. Nous décrivons ici trois ligands des DNF : le ^{18}F -FDDNP, le ^{18}F -THK523 et le ^{18}F -T808 (Fig. 97).

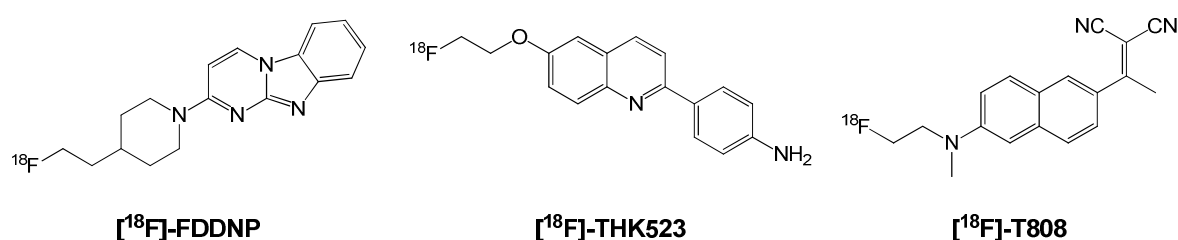


Fig. 97. Marqueurs des DNF pour l'imagerie PET

Le composé ^{18}F -FDDNP (2-(1-(6-[(2- ^{18}F]fluoroéthyl)(méthyl)amino]-2-naphtyl)éthylidène)malonitrile) est le principal radiotraceur connu des DNF²⁴⁷. Il marque également les dépôts amyloïdes. Chez l'homme, la rétention de ce composé a montré une bonne corrélation avec la répartition des DNF en immuno-histochimie avec une bonne accumulation dans l'hippocampe, lieu de localisation préférentiel des DNF. Le ^{18}F -FDDNP serait plus performant que le traceur ^{18}F -FDG pour distinguer les sujets sains de

247. Shin, J.; Kepe, V.; Barrio, J. R.; Small, G. W., The Merits of FDDNP-PET Imaging in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, 26, 135-145.

ceux atteints de la maladie d'Alzheimer. Cependant l'utilisation en routine de ce composé semble limitée car le radiomarquage et la stabilité de ce produit sont très aléatoires et sa spécificité très faible avec une rétention importante dans la substance blanche.

Fodero-Tavoletti et al.²⁴⁸ ont décrit récemment le ¹⁸F-THK523 comme nouveau radiotraceur des DNF. Il possède une forte affinité pour les fibres de tau tandis que son affinité pour les fibres d'Aβ est plus faible. Des études *in vitro* sur des coupes de cerveaux de souris ou humaines montre une bonne co-localisation de ce radiotraceur avec les DNF et non avec les dépôts d'Aβ. L'étude de la biodistribution du ¹⁸F-THK523 chez des souris transgéniques indique qu'il pénètre rapidement dans le cerveau et est éliminé progressivement du tissu cérébral au cours du temps. La rétention du traceur est également plus importante dans les cerveaux des souris transgéniques ne possédant que des DNF par rapport à celle observée dans les cerveaux de souris ne possédant que des plaques amyloïdes.

Récemment Zhang et al.²⁴⁹ ont décrit un nouveau radioligand, le ¹⁸F-T808. Ce composé présente une sélectivité et une spécificité de liaison aux DNF par rapport aux dépôts d'Aβ sur des coupes de cerveaux humains. Le profil de répartition cérébrale des DNF obtenu avec ce radiotraceur dans cette étude *in vitro* est bien corrélé à la distribution connue des DNF dans le cerveau humain. De plus, peu de bruit de fond de liaison est observé et ce traceur ne se lie pas à la substance blanche, ce qui contribue à sa sélectivité. *In vivo*, chez la souris et le rat, le ¹⁸F-T808 est caractérisé par une rapide pénétration et élimination cérébrale. Cependant aucune liaison de ce traceur aux DNF n'est observée en autoradiographie chez des souris transgéniques (où la présence de DNF a été au préalable confirmée). Les auteurs supposent que les DNF formées chez la souris sont différentes de celles présentes chez l'humain.

II.5.1.2. Modèles de souris

Plusieurs souris transgéniques sont utilisées comme modèles de la maladie d'Alzheimer^{250,251}. Elles appartiennent à trois catégories selon le nombre de transgènes

248.Fodero-Tavoletti, M. T.; Okamura, N.; Furumoto, S.; Mulligan, R. S.; Connor, A. R.; McLean, C. A.; Cao, D.; Rigopoulos, A.; Cartwright, G. A.; O'Keefe, G., 18F-THK523: a novel *in vivo* tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* **2011**, *134* (4), 1089-1100.

249.Zhang, W.; Arteaga, J.; Cashion, D. K.; Chen, G.; Gangadharmath, U.; Gomez, L. F.; Kasi, D.; Lam, C.; Liang, Q.; Liu, C., A Highly Selective and Specific PET Tracer for Imaging of Tau Pathologies. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**.

250.McGowan, E.; Eriksen, J.; Hutton, M., A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.* **2006**, *22* (5), 281-289.

251.Duyckaerts, C.; Potier, M.-C.; Delatour, B., Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl)*. **2008**, *115* (1), 5-38.

qu'elles possèdent : les souris simple, double et triple transgéniques (pour revue : références 250 et 251).

Les souris simple transgéniques possèdent un gène supplémentaire muté leur permettant d'exprimer les lésions β amyloïdes ou les DNF. L'insertion d'un gène APP humain muté seul permet la production du peptide A β et l'insertion du gène muté de la protéine tau induit le développement de DNF. Les souris double transgéniques sont caractérisées par l'insertion de deux gènes mutés humains. Il s'agit en général des gènes mutés de l'APP et de la β ou γ -sécrétase. La co-transfection de la PS1 (préséniline 1 ou γ -sécrétase) humaine mutée avec l'APP humaine mutée résulte en une augmentation de la production des plaques amyloïdes et de leur vitesse d'apparition. Ces souris présentent plusieurs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : production et agrégation dans le tissu cérébral du peptide A β , altération des fonctions synaptiques et développement de troubles du comportement. Cependant ces modèles présentent une topographie cérébrale des lésions différente de celle observée chez l'homme et ne possèdent pas la pathologie neurofibrillaire.

Ainsi, des souris triple transgéniques (3xTg) possédant les gènes APP, PS1 et tau humains mutés ont été développées. Ces modèles de souris présentent des plaques amyloïdes et des DNF. L'étude de nos composés *in vivo* a été réalisée chez des souris 3xTg²⁵². Dans ces modèles le peptide A β est retrouvé en grande quantité dans le cortex, l'hippocampe et le thalamus. La quantité de peptide A β (en particulier A β_{40} et A β_{42}) augmente en fonction de l'âge. Les premiers dépôts extracellulaires sont visibles à l'âge de 6 mois dans le cortex préfrontal. A partir de 12 mois, la présence des plaques amyloïdes est mise en évidence dans différentes régions corticales et dans l'hippocampe. Les premières formes neuropathologiques de la protéine tau dans l'espace intraneuronal apparaissent à l'âge de 12 mois et sont mises en évidence dans l'hippocampe. La progression des lésions de la protéine tau vers les régions corticales se fait plus tardivement. La progression des lésions β amyloïdes et de tau est similaire à celle observée chez l'homme. Enfin, ces souris développent une dysfonction synaptique dans les régions concernées par les processus mnésiques.

La présence de plaques amyloïdes et de DNF est confirmée par immunohistochimie (Fig. 98) sur des coupes de cerveaux de souris 3xTg (âgées de 18 mois).

252.Oddo, S.; Caccamo, A.; Kitazawa, M.; Tseng, B. P.; LaFerla, F. M., Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2003**, 24 (8), 1063-1070.

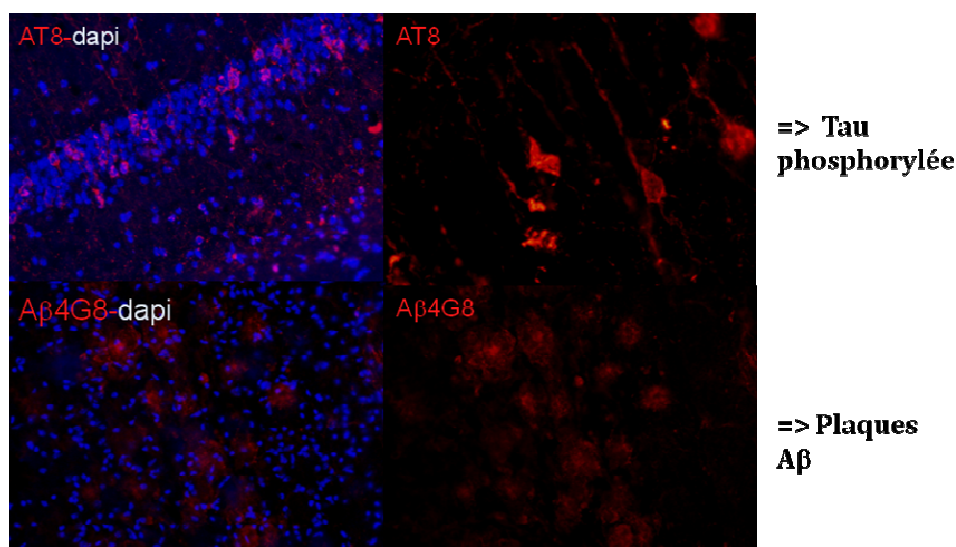


Fig. 98. Immuno-histochimie visualisant les plaques amyloïdes et les DNF chez les souris 3xTg (réalisée par l'équipe du Pr. Ghezzi)

Les DNF sont détectées par un marquage positif avec l'anticorps AT8 qui se lie spécifiquement à la protéine tau phosphorylée (Fig. 98). Ce marquage montre une accumulation de la protéine tau phosphorylée principalement à l'intérieur des neurones. Les plaques amyloïdes sont visualisées par un marquage positif avec l'anticorps A β _{4G8} (Fig. 98). Ces lésions apparaissent sous forme d'amas à l'extérieur des neurones.

L'absence de ces lésions a également été vérifiée chez les souris sauvages (non atteintes de la maladie d'Alzheimer) âgées de 18 mois. Ceci permet de valider les souris 3xTg en tant que modèle spécifique adapté à l'étude de la maladie d'Alzheimer.

II.5.2. Radiomarquage des composés

Alberto et al ont conçu et développé un cœur Tc-tricarbonyle, de formule ($^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$), qui a apporté un regain d'intérêt dans la conception de produits radiopharmaceutiques technétiés^{253,254}. Ce précurseur par sa nature organométallique est capable de se complexer à un grand nombre de ligands ce qui en fait un bon candidat pour le radiomarquage de molécules biologiques utilisées à des fins diagnostiques et

253.(a) Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; August Schubiger, P.; Herrmann, W. A.; Artus, G.; Abram, U.; Kaden, T. A., Metal carbonyl syntheses XXII. Low-pressure carbonylation of $[\text{MOC}l_4]^-$ and $[\text{MO}_4]^-$. The technetium (I) and rhenium (I) complexes $[\text{NEt}_4][\text{MCl}_3(\text{CO})_3]$. *J. Organomet. Chem.* **1995**, 492 (2), 217-224; (b) Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, A. P.; Abram, U.; Kaden, T. A., A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[\text{Tc-}^{99m}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[(\text{TcO}_4)^- - \text{Tc-}^{99m}]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (31), 7987-7988.

254.Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finnnern, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli, A.; Abram, U.; Mach, J.-P.; Plückthun, A., Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc (I)-carbonyl complex. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 897-901.

thérapeutiques. L'intermédiaire Tc-tricarbonyl échange rapidement ses molécules d'eau avec d'autres donneurs tandis que les groupements carbonyles (CO) sont stables. Des études ont montré que l'histidine est le meilleur ligand pour des composés peptidiques et que sa position à leurs extrémités N-terminales est la plus favorable pour le radiomarquage^{254,255}. Le précurseur Tc-tricarbonyl existe de nos jours sous forme d'un kit de formulation qui est disponible commercialement sous le nom Isolink®. La complexation du ^{99m}Tc par l'histidine est représentée ci-dessous (Fig. 99)

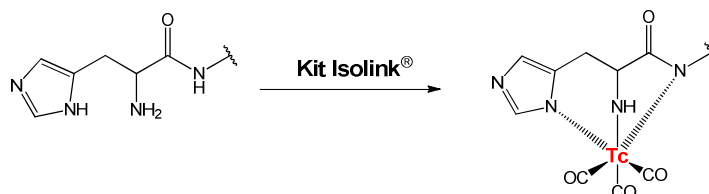


Fig. 99. Complexation du ^{99m}Tc par l'histidine avec le kit Isolink®

II.5.2.1. Molécules contrôles

Le radiomarquage de la D6C-His/2Alloc **78** est présenté ci-dessous (Fig. 100). Un pic majoritaire en CLHP est observé après marquage au ^{99m}Tc et le composé marqué est stable 6 h après le radiomarquage. D'après le chromatogramme, une seule espèce majoritaire est formée lors de cette étape de radiomarquage, et stable dans le temps.

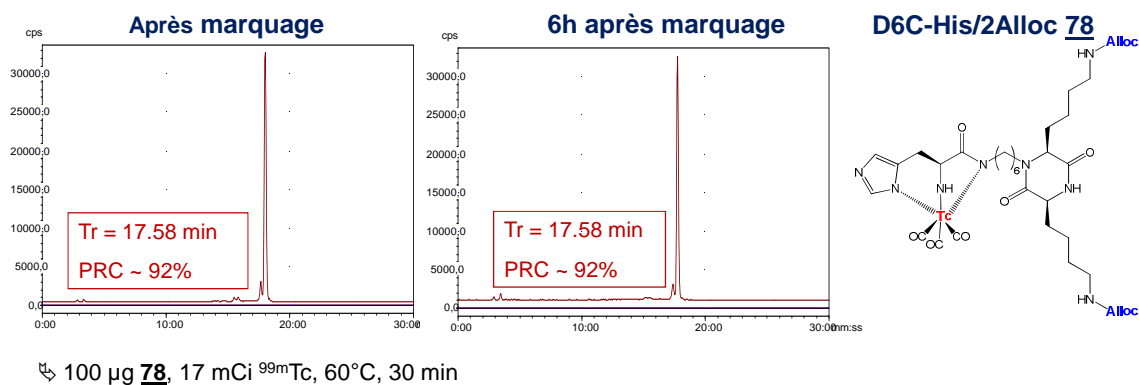


Fig. 100. Chromatogrammes obtenus pour le radiomarquage de la D6C **78**

De la même façon les D3C-His/2Alloc **79** et D3C-His/2NH₂ **81** ont également pu être radiomarquées. En particulier, cela indique que les amines libres des chaînes latérales des lysines du cycle DCP ne gênent pas l'étape de radiomarquage.

255.Egli, A.; Alberto, R.; Tannahill, L.; Schibli, R.; Abram, U.; Schaffland, A.; Waibel, R.; Tourwé, D.; Jeannin, L.; Iterbeke, K., Organometallic ^{99m}Tc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J. Nucl. Med.* **1999**, 40 (11), 1913.

Les peptides linéaires HKLVFFA **82** et HVQIVYK **83** ont également été marqués avec succès au ^{99m}Tc avec le kit Isolink®. Un exemple de chromatogramme obtenu pour le peptide VQIVYK **83** est présenté ci-dessous (Fig. 101). Le profil indique qu'une bonne pureté radiochimique est obtenue.

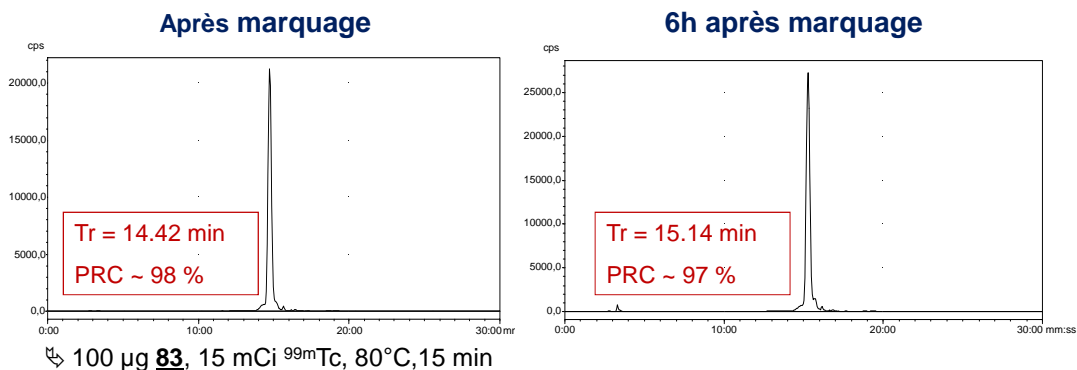


Fig. 101. Exemples de chromatogrammes du radiomarquage du peptide HVQIVYK **83**

II.5.2.2. DCP présentant des séquences peptidiques

Le marquage des DCP présentant des peptides VQIVYK liés par leurs extrémités C-terminales (D6C-His/2KYVIQV **86** D3C-His/2KYVIQV **87**) est non spécifique. Plusieurs conditions de marquage ont été testées en variant la quantité de ^{99m}Tc utilisée, le temps et la température d'incubation. Les profils CLHP obtenus indiquent que la pureté radiochimique n'est pas suffisante. Le nombre de carbones de la chaîne alkyle portant l'histidine a été réduit de trois carbones afin de diminuer sa flexibilité et des éventuelles interactions entre l'histidine et les chaînes peptidiques mais le marquage de la D3C-His/2KYVIQV **87** reste non spécifique. Deux exemples des chromatogrammes obtenus pour l'assemblage D3C-2VQIVYK **87** sont présentés ci-dessous (Fig. 102). Les pics obtenus sont dédoublés et élargis, ce qui indique la présence de plusieurs espèces radiomarquées.

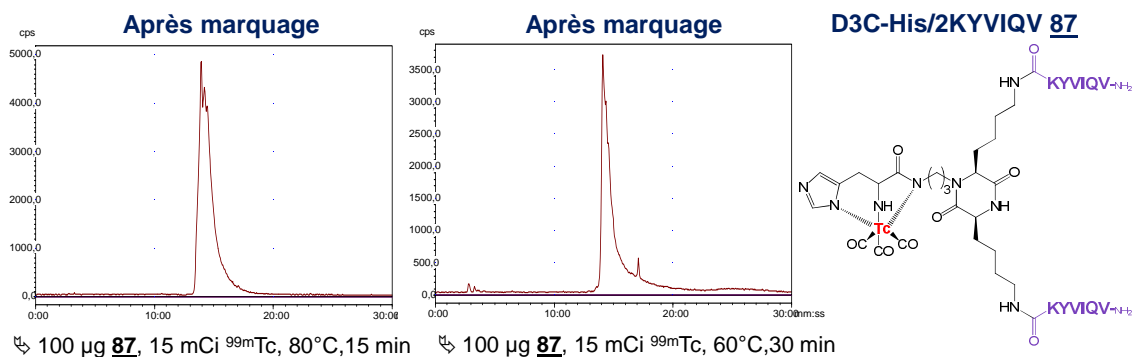


Fig. 102. Chromatogrammes obtenus pour le radiomarquage de la D6C **87**

Les D3C-His/KLVFFA **89** et D3C-His/VQIVYK **90** ont été radiomarquées au ^{99m}Tc avec le kit Isolink® avec succès. Le radiomarquage est stable dans le temps et les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-dessous (Fig. 103). Le composé **90** a été étudié de manière plus approfondie *in vivo* chez la souris.

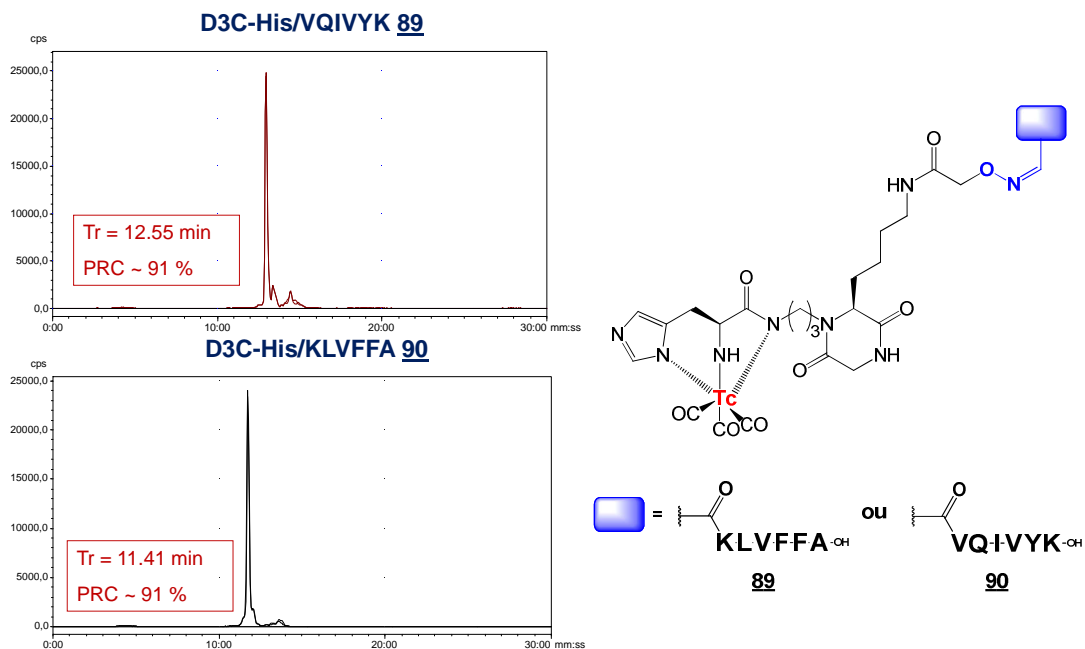


Fig. 103. Radiomarquage des D3C **89** et **90** : superposition des profils CLHP immédiatement après radiomarquage et après 6h

Le radiomarquage au ^{99m}Tc de la D3C-His/2KLVFFA **92** a été réalisé avec succès tandis que celui de la D3C-His/2VQIVYK **93** n'est pas spécifique. Les conditions de marquage (quantités de ^{99m}Tc introduites, durée et température) restent dans ce cas à optimiser.

II.5.2.3. DCP présentant l'ATPZ

La D3C-His/1ATPZ **94** a été marquée avec succès (Fig. 104) tandis que le marquage de la D3C-His/2ATPZ **95** est non spécifique (le même type de chromatogramme présenté Fig. 102 est obtenu) et doit être optimisé.

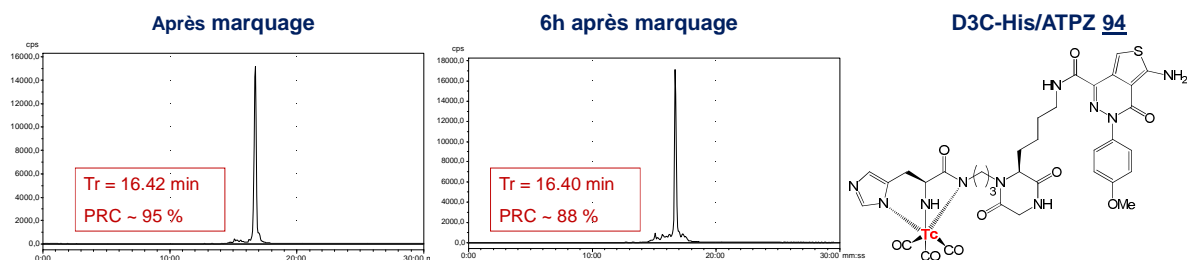


Fig. 104. Radiomarquage de la D3C-His/ATPZ **94**

Le radiomarquage de nos composés ne s'est pas toujours avéré facile. En effet, toutes les molécules n'ont pas pu être radiomarquées au ^{99m}Tc . Par contre, les composés radiomarqués possèdent une bonne pureté radiochimique (supérieure à 90%) et une bonne stabilité temporelle (jusqu'à 6 heures) dans le milieu de marquage. Ces composés sont donc propices pour des tests *in vivo* chez la souris.

II.5.3. Biodistribution chez les souris sauvages et 3xTg

Dans un premier temps le châssis seul (DCP contrôles **78** et **79**) a été testé *in vivo* chez des souris sauvages (non atteintes de la maladie d'Alzheimer) âgées de 18 mois. Dans un second temps, la biodistribution des D3C présentant un motif de reconnaissance peptidique (D3C-His/KLVFFA **89** et D3C-His/VQIVYK **90**) a été réalisée chez les souris sauvages et 3xTg.

II.5.3.1. DCP contrôles

Les DCP contrôles **78** et **79** ont été injectées chez les souris sauvages afin de tester leur pénétration cérébrale. Brièvement, l'étude de la biodistribution de ces composés consiste à injecter le composé dans la veine caudale des souris puis à sacrifier les animaux à plusieurs temps *post* injection : 5, 10 et 45 min. Une microdissection des différents organes dont le cerveau est effectuée. Différentes structures cérébrales sont isolées : le cortex frontal, le striatum (contenant les deux ventricules latéraux où circule le LCR), l'hippocampe et le cervelet (Fig. 105). La quantification du pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (DI/g) est réalisée par comptage de la radioactivité du ^{99m}Tc dans un compteur gamma.

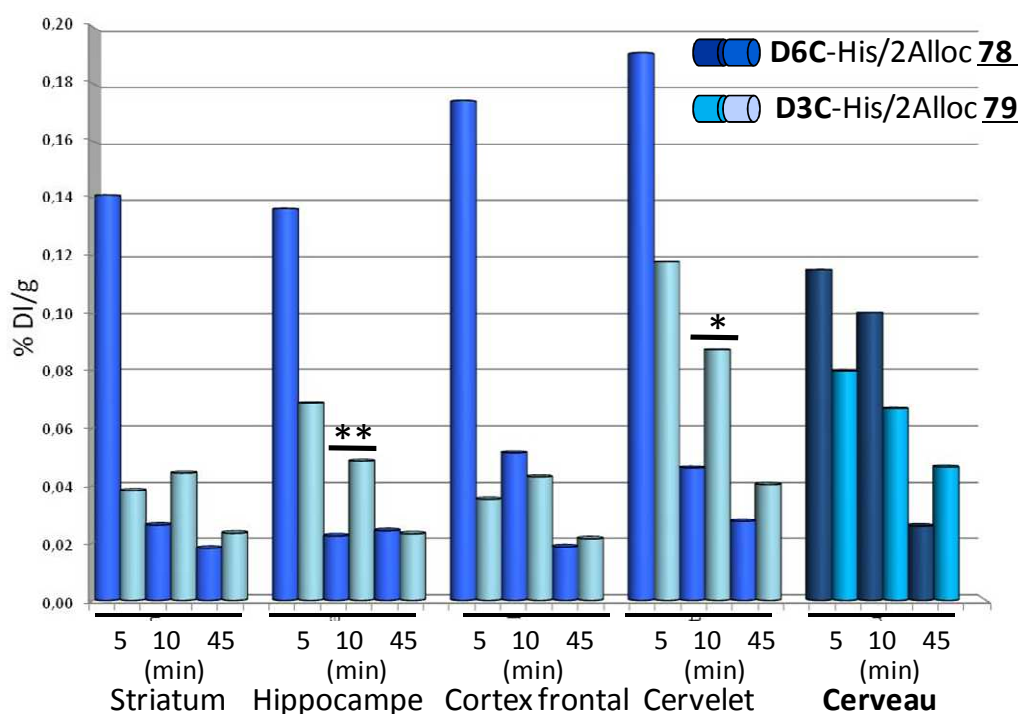


Fig. 105. Biodistribution cérébrale des radiotraceurs **78** et **79** chez les souris sauvages à des différents temps de sacrifices (temps *post* injection en minutes). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Les données de biodistribution indiquent que les radiotraceurs ont un métabolisme important au niveau du foie (bonne élimination) et de l'intestin grêle. Ils sont aussi éliminés rapidement dans l'urine. Pour les deux composés **78** et **79**, la biodistribution dans le cerveau est similaire : à 10 min la DI/g est de $\approx 0,1\%$ et $\approx 0,07\%$ respectivement (Fig. 106). Quelques différences sont tout de même observées entre les D6C-His/2Alloc **78** et D3C-His/2Alloc **79**. Pour un temps long (45 min), la D3C-His/2Alloc **79** est plus stable (activité persistante plus intense) dans tout le cerveau. L'activité de ce composé est plus importante dans l'hippocampe ($t=10$ min) et dans le cervelet ($t=10$ min). C'est pourquoi cette longueur de chaîne a été retenue pour présenter des modules de reconnaissance du peptide A β et de la protéine tau.

En autoradiographie, les deux radiotraceurs se retrouvent dans le cortex frontal, dans les deux ventricules latéraux, autour de l'hippocampe et dans le cervelet (Fig. 106).

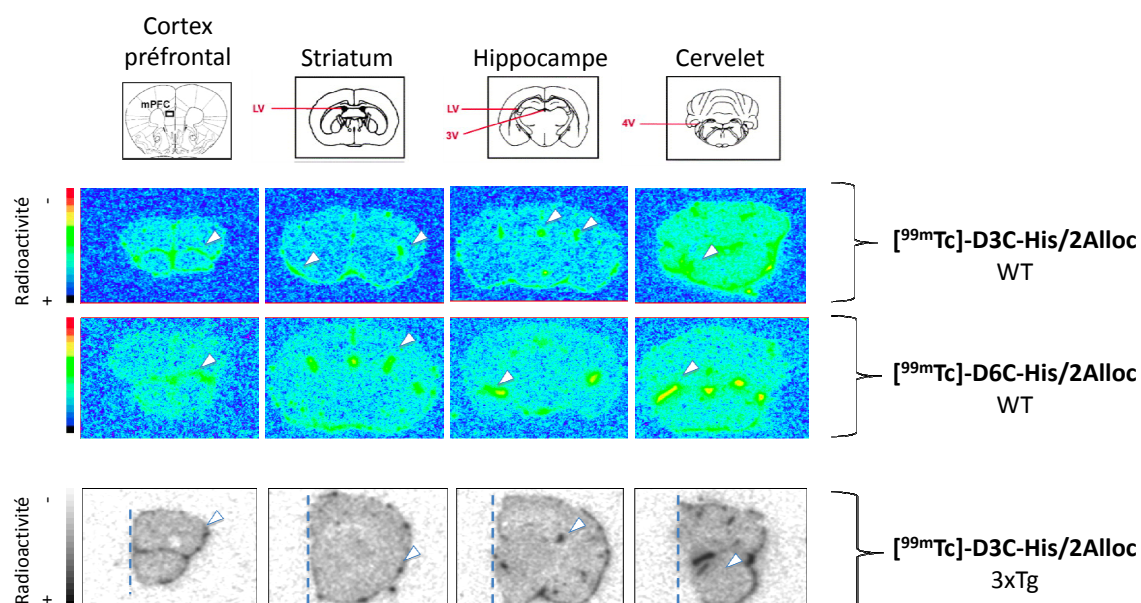


Fig. 106. Autoradiographie des radiotraceurs 78 et 79 chez les souris sauvages (WT) et 3xTg

L'autoradiographie du cervelet doit être interprétée avec précaution. En effet, cette structure est très vascularisée et les images reflètent également sa composante sanguine (ce qui pourrait expliquer un marquage plus intense dans cette zone). Dans l'hippocampe et le cortex frontal, ce sont les zones ventriculaires contenant le LCR qui sont les plus marquées. La présence des traceurs dans le LCR indique que les composés pénètrent dans le cerveau. Des expérimentations dans lesquelles les souris sont perfusées avant l'autoradiographie montrent que le radiomarquage persiste dans le LCR (données non montrées). Enfin, les radiotraceurs sont retrouvés au niveau des méninges, zones bien vascularisées et riches en LCR.

II.5.3.2. Châssis D3C présentant des motifs de reconnaissance

Les mêmes expérimentations ont été effectuées pour le composé D3C-His/VQIVYK 90. Comme précédemment, l'élimination hépatique et urinaire est rapide. La donnée « cerveau » correspond à la moyenne de l'activité dans les quatre structures observées par autoradiographie. La biodistribution cérébrale obtenue pour la D3C 90 est donnée ci-dessous (Fig. 107).

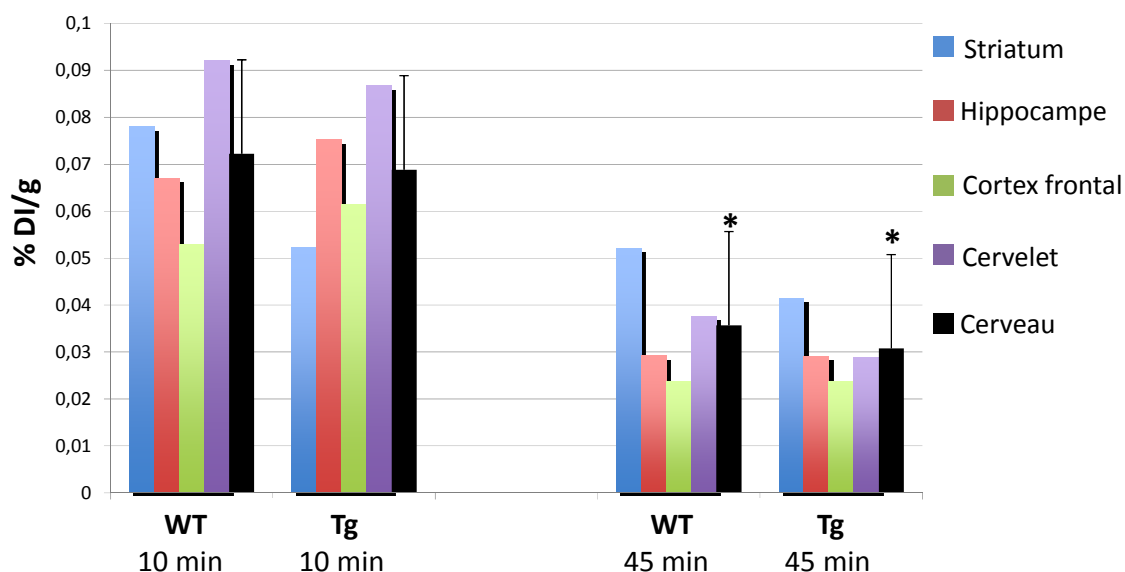


Fig. 107. Biodistribution cérébrale de la D3C-His/VQIVYK 90 chez les souris sauvages (WT) ou 3xTg (* p<0.05) aux temps 10 et 45 minutes

La biodistribution dans les structures cérébrales de la D3C 90 est similaire à celle obtenue pour les DCP contrôles 78 et 79 chez les souris sauvages et 3xTg. Par exemple la D3C 90 et la D3C contrôle 79 possèdent des activités similaires dans le cerveau à 10 min chez les souris sauvages d'environ 0,07% et 0,06% (DI/g) respectivement (Fig. 108). Ceci indique que l'introduction de la séquence peptidique sur le châssis DCP ne gêne pas la pénétration cérébrale.

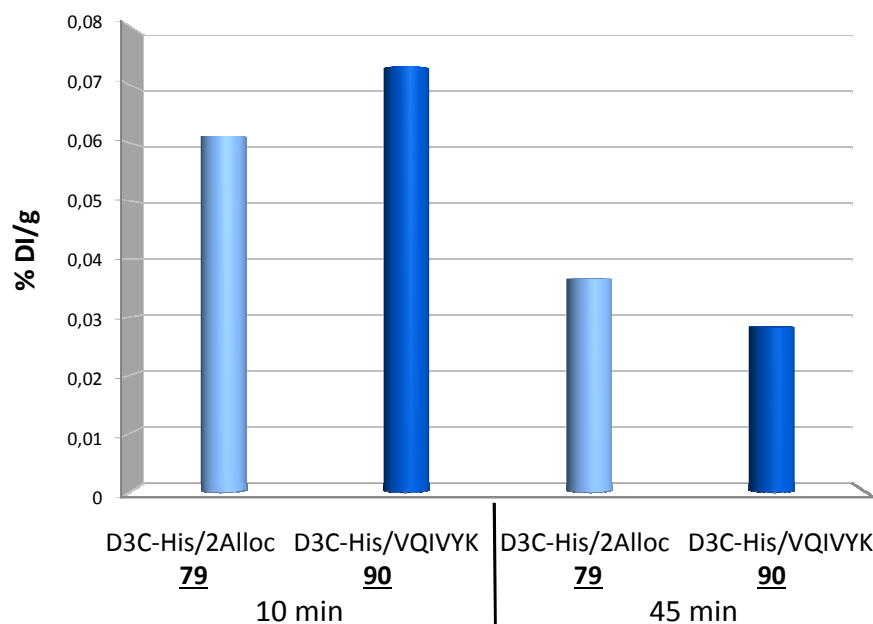


Fig. 108. Comparaison des biodistributions des D3C-His/2Alloc 79 et D3C-His/VQIVYK 90 chez les souris sauvages dans le cerveau.

L'autoradiographie (à 10 min) *in vivo* montre que le radiotraceur entre dans le cortex frontal, le striatum, autour de l'hippocampe et dans le cervelet, principalement dans zones ventriculaires de ces structures contenant le LCR (Fig. 109) chez la souris.

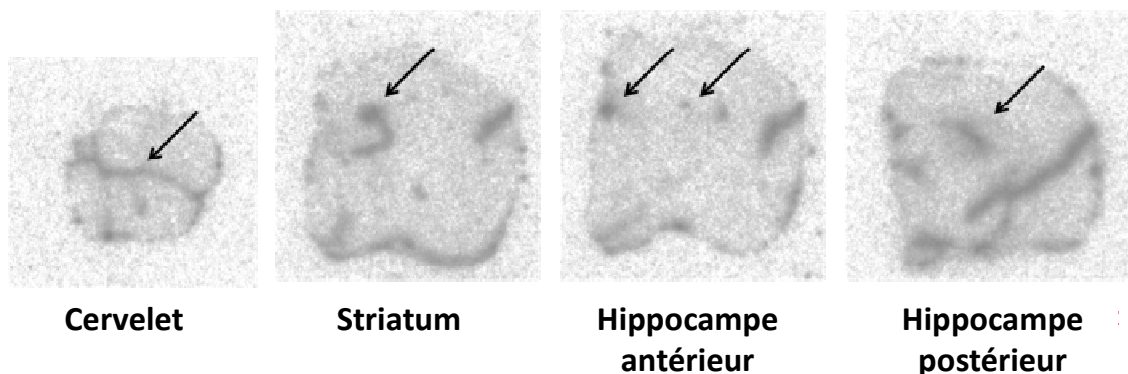


Fig. 109. Autoradiographie cérébrale de la D3C 90 chez la souris au temps 10 min

Bien que ces données tendent à montrer que le radiotraceur 90 pénètre dans le cerveau des souris sauvages et 3xTg, des expérimentations doivent être répétées pour obtenir un nombre d'animaux suffisant pour effectuer des statistiques. Un temps supplémentaire (t=5 min) doit également être effectué. Le peptide linéaire HVQIVYK 83 a également été testé chez ces souris. L'imagerie nucléaire montre que ce composé ne pénètre pas dans le cerveau. Les analyses étant qualitatives et non quantitatives, elles ne seront pas détaillées ici. Les résultats obtenus indiquent que le châssis D3C est un vecteur pour la pénétration cérébrale du motif VQIVYK.

II.5.3.3. Synthèse des résultats et conclusion

Le radiomarquage au ^{99m}Tc de la plupart de nos composés a été réalisé (pour les autres la mise au point est en cours). Ces composés peuvent donc être évalués *in vivo* chez la souris. Les résultats obtenus pour les châssis D6C 78 et D3C 79 ne présentant pas de motif de reconnaissance ont montré que ces composés pénètrent dans le cerveau chez des souris sauvages. Le châssis D3C possède une pénétration cérébrale légèrement supérieure à celle du châssis D6C. De plus, nous avons supposé qu'une chaîne aminoalkyle plus courte sur un des azotes du cycle DCP permettrait de diminuer la flexibilité au niveau du site de liaison de l'histidine et donc diminuerait les interactions éventuelles avec le complexe de ^{99m}Tc formé. Une longueur de chaîne à trois carbones a donc été choisie pour la synthèse des radioligands.

L'étude de la D3C-His/VQIVYK 90 chez des souris sauvages et 3xTg montrent que ce composé entre également dans le cerveau (tandis que le peptide seul HVQIVYK 83 ne

rentre pas). Le châssis D3C semble, d'après ces résultats, être un vecteur pour le motif VQIVYK facilitant sa pénétration cérébrale. Des tests sur des animaux supplémentaires (deux souris sauvages et 3xTg) permettront de réaliser des statistiques pour ce composé.

Des expérimentations ont également été réalisées pour la D3C-His/KLVFFA **89**. Cependant le nombre d'animaux testé est faible et les données obtenues sont hétérogènes. Pour une moitié des animaux la pénétration cérébrale est comparable (même ordre de grandeur) aux DCP contrôles tandis que pour l'autre moitié l'activité est environ dix fois supérieure à celle obtenue pour les DCP contrôles (avec les souris sauvages ou 3xTg). Des tests supplémentaires sur un plus grand nombre d'animaux permettront d'établir l'activité de composé.

La D3C-His/ATPZ **94** a également été injectée chez des souris, mais le lot d'animaux utilisé présentait des anomalies périphériques (tumeurs intestinales) et les expérimentations sont donc à réitérer.

La D3C-His/2KLVFFA **92** doit être testée *in vivo* prochainement (radiomarquage effectué avec succès). En effet, la présentation de deux ligands sur le châssis D3C est supposée augmenter l'affinité de liaison à la cible biologique.

Enfin, le radiomarquage des D3C-His/2VQIVYK **93** et D3C-His/2ATPZ **95** doit être optimisé avant leur étude *in vivo*. Des expériences *ex vivo* de liaison des composés sur des coupes de cerveaux de souris possédant des plaques amyloïdes et des DNF, permettront d'évaluer la spécificité des composés pour une ou l'autre des lésions.

II.6. Conclusion

Afin de cibler le processus de fibrillation du peptide A β ₄₀ et de la protéine tau qui sont les acteurs principaux de la maladie d'Alzheimer, nous avons synthétisé des assemblages multivalents présentant des peptides ou des molécules hétéroaromatiques sur un châssis dicétopiperazine. Ce châssis n'était pas développé au laboratoire avant ce projet comme châssis multivalent. Dans un premier temps, nous avons donc mis au point la synthèse de châssis DCP possédant plusieurs sites de fixation. Ces sites ont été apportés par l'utilisation de résidus lysine et par N-alkylation d'un des atomes d'azote du squelette DCP *via* une chaîne aminoalkyle à trois ou six carbones. Notre stratégie de synthèse, adaptée de la littérature, nous a permis d'accéder à différents châssis D6C et D3C possédant différents groupes protecteurs orthogonaux et ainsi à des châssis « azotures » ou « oxyamines » chimiosélectivement fonctionnalisables par les molécules d'intérêt. Bien que la DCP soit un cyclopeptide, sa synthèse diffère de celle de peptides de

plus grande taille. En effet, le châssis est synthétisé en solution, nécessite plusieurs étapes de purification sur colonne de gel de silice et sa précipitation est difficile. Certains de ces châssis ont été synthétisés avec de bons rendements (D6C-Boc/2Alloc **11** et D6C-Alloc/2Boc **22**) tandis que les voies de synthèses d'autres restent à optimiser. En particulier, l'étape d'alkylation de la lysine par réaction de Mitsunobu s'est avérée problématique avec une chaîne aminoalkyle à trois carbones (D3C-Boc/Alloc **12**, D3C-Boc/Alloc **16**). Le suivi de la réaction et la purification (élimination de l'oxyde de triphénylphosphine) ont été difficiles. L'utilisation de la triphénylphosphine greffée sur un support solide pourrait être une solution pour optimiser cette étape. La coupure des groupes Alloc, utilisés comme protection des fonctions amines dans certains châssis, a également nécessité une mise au point de la purification. Enfin, lors du couplage des motifs peptidiques et hétéroaromatiques, quelques difficultés ont été rencontrées. Les séquences peptidiques choisies sont connues pour former des structures en feuillets β lors de la fibrillation du peptide A β et de la protéine tau. Ces séquences s'agrègent facilement en solution et les conditions de couplage ont donc du être optimisées pour minimiser ce phénomène et obtenir efficacement nos assemblages. Les composés hétéroaromatiques quant à eux, comme en particulier le curcumin, sont peu solubles dans les conditions de couplage (DMF/HEPES) et la purification des assemblages correspondants a aussi été problématique dans certains cas pour les mêmes raisons de solubilité.

La synthèse d'assemblages pouvant être radiomarqués au ^{99m}Tc a également été développée et a été réalisée par une stratégie différente. L'introduction du résidu histidine essentielle au marquage ultérieur a été réalisée en premier lieu sur la chaîne aminoalkyle portée par un des azotes du cycle DCP.

Le châssis DCP a également été choisi pour son potentiel de « navette » pour passer la barrière hémato-encéphalique. Les châssis comportant une histidine ont été radiomarqués au ^{99m}Tc et testés *in vivo* chez la souris. Les châssis D3C **78** et D6C **79** ne présentant pas de motif de reconnaissance pénètrent dans le cerveau. Le châssis présentant un motif VQIVYK (D3C **90**), supposé cibler la protéine tau, pénètre dans le cerveau contrairement au peptide de référence HVQIVYK **83** et avec un pourcentage de pénétration comparable à son homologue sans séquence (D3C **79**). Ces premiers résultats semblent indiquer que le châssis D3C est un transporteur pour le passage de la barrière hémato-encéphalique de la séquence VQIVYK. Des tests supplémentaires avec un plus grand nombre d'animaux permettront de faire des statistiques. Des études de liaison *ex vivo* du composé sur des coupes de cerveaux de souris possédant des plaques amyloïdes et des DNF permettront d'évaluer la spécificité de liaison du composé à la protéine. Enfin,

les composés présentant deux motifs VQIVYK, un ou deux motifs KLVFFA et un ou deux motifs ATPZ sont en cours d'évaluation.

L'effet de la présentation multimérique a été testé *in vitro* par des tests d'inhibition de la fibrillation du peptide A β ₄₀. Des travaux antérieurs avaient démontré l'intérêt de la présentation multimérique de molécules pour la conception d'inhibiteurs de la fibrillogénèse^{130,226}. La présentation multimérique permet d'obtenir une meilleure activité inhibitrice de la fibrillation avec les assemblages peptidiques présentant deux ou trois motifs pour des ratios inférieurs à un ratio équimolaire. La meilleure activité est obtenue avec la D6C-NH₂/2KLVFFA **49** (motifs liés par leur extrémité N-terminale) avec une inhibition de la fibrillation supérieure à 80% pour un ratio 1:0,02. La présentation d'un troisième motif sur la D6C n'entraîne pas une forte augmentation du pouvoir inhibiteur par rapport aux composés à deux motifs. Ceci peut être attribué à l'orientation dans l'espace qui n'est peut être pas favorable à l'interaction avec la cible. En revanche, la présentation multimérique des motifs hétéroaromatiques choisis n'apporte pas de gain d'activité. Le pouvoir inhibiteur obtenu est néanmoins comparable à celui observé avec les molécules de références non liées sur le châssis.

Quant à la spécificité, le motif KLVFFA en surface de nos assemblages semble présenter une spécificité de séquence pour le peptide A β ₄₀. En effet, les D6C présentant un à trois motifs VQIVYK n'inhibent pas la fibrillation de ce peptide. Les tests sur la fibrillation de la protéine tau nécessaires pour pouvoir répondre à la spécificité tau *versus* A β de nos composés doivent être effectués prochainement. En effet, la protéine tau a récemment été produite et purifiée au laboratoire grâce à la collaboration avec l'équipe du Pr. Ghezzi.

III. Chapitre 2 : Conception de mimes de la protéine tau pour l'étude de sa fibrillation *in vitro*

La protéine tau est une protéine désordonnée et hautement soluble dans des conditions physiologiques⁷⁰. Elle permet de stabiliser les microtubules et aide au transport des organelles dans les neurones. Son attachement aux microtubules est régulé par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. Dans plusieurs démences, cette protéine s'agrège sous forme de fibres amyloïdes à l'intérieur du neurone formant des dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Il semblerait que dans ces pathologies la protéine soit phosphorylée anormalement (hyperphosphorylation) ce qui entraînerait son détachement des microtubules et lui permettrait d'adopter une structure capable de former des fibres^{43,44}. Le processus de fibrillation de la protéine tau est encore mal connu. De plus, la structure des fibres n'est pas résolue car elles ne sont pas cristallisables. Les mécanismes permettant l'assemblage de protofilaments en une fibre mature ont été étudiés. Des fibres de la protéine tau similaires à celles observées dans les DNF extraites de cerveaux humains peuvent être reproduites *in vitro* à partir de protéines recombinantes obtenues en système bactérien^{56,57}. Pour former des fibres, la protéine tau doit être phosphorylée ou mise en présence d'inducteurs anioniques. Ces fibres possèdent les caractéristiques des fibres amyloïdes en microscopie électronique (ME) et à force atomique (AFM), présentent un motif de diffraction par rayons X en feuillets β croisés et réagissent avec des colorants spécifiques de ces structures la Thioflavine T (ThT) et la Thioflavine S (ThS)⁴⁸.

Afin d'étudier le processus de fibrillation de la protéine tau *in vitro*, nous proposons de synthétiser un mime de la protéine. Pour cela, des séquences peptidiques de la protéine tau potentiellement impliquées dans le processus de fibrillation ont été sélectionnées par modélisation moléculaire. Ces peptides correspondent à des séquences trouvées dans les motifs de répétition de liaison aux microtubules qui sont impliqués dans la formation du cœur hydrophobe. En effet, il a été montré que des mutants produits en système bactérien et possédant uniquement ces motifs peuvent s'assembler *in vitro* en fibres plus rapidement que les isoformes de tau naturelles^{56,70}. L'utilisation de mimes synthétiques permettrait de réaliser des tests de fibrillation *in vitro* plus rapidement. Les séquences peptidiques sont étudiées seules ou couplées sur un châssis moléculaire, la dicétopiperazine (DCP). La présentation de ces séquences sur un châssis permet d'augmenter la concentration locale en peptide et de faciliter les interactions entre eux. Le châssis impose une pré-organisation dans l'espace des peptides. De plus, du fait de sa petite taille la DCP ne devrait pas entraîner de gêne stérique qui pourrait interférer avec la fibrillation. Cette stratégie a déjà fait ses preuves au sein de notre laboratoire¹²⁸⁻¹³⁰.

pour la conception de mimes synthétiques des fibres du peptide $A\beta_{40}$. Pour cela une séquence plus courte de ce peptide supposée essentielle pour reproduire les fibres, a été couplée sur un châssis moléculaire : le cyclodécapeptide. La séquence $A\beta_{16-37}$ contenant les résidus impliqués dans la formation du feuillet β a été choisie pour construire le modèle des fibres. Cette séquence a été greffée sur le cyclodécapeptide afin de les orienter de façon définie dans l'espace (Fig. 110). Quatre assemblages ont été synthétisés présentant : quatre peptides (4Lin), deux peptides (2Lin), deux (2Loop) et quatre (4Loop) peptides pré-organisés en boucles. L'étude structurale (microscopie et dichroïsme circulaire) de ces composés a montré que ces édifices sont capables de s'auto-assembler en protofilaments similaires à ceux formés par le peptide $A\beta_{40}$ quand ils sont incubés dans du tampon phosphate.

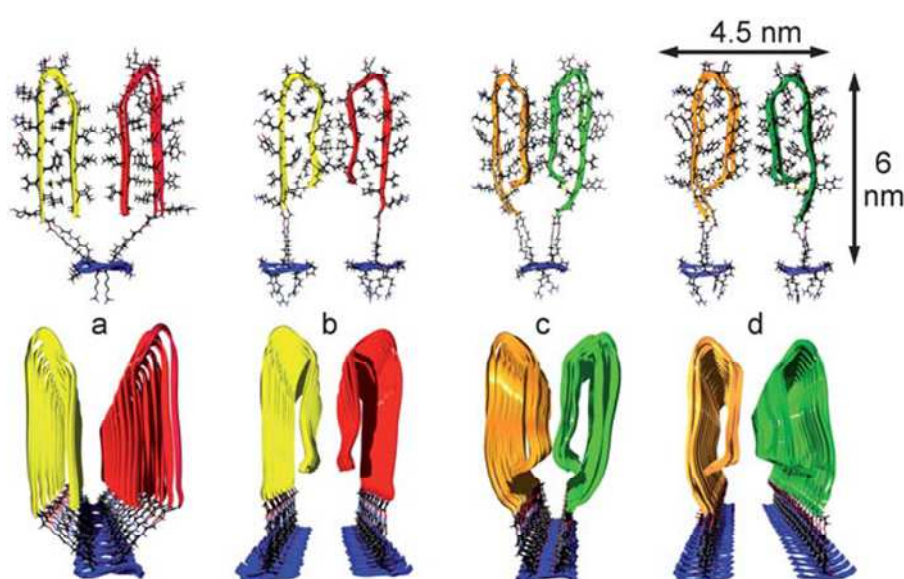


Fig. 110. Structures des modèles de fibres du peptide $A\beta_{40}^{128}$ (a) 4Lin (b) 2Lin (c) 4Loop (d) 2Loop

III.1. Etat de l'art

III.1.1. Fibrillation de la protéine tau

III.1.1.1. Fibrillation de la protéine tau in vitro

La protéine tau est une protéine non structurée en conditions physiologiques⁷⁰. La protéine htau40 native possède environ 29% d'acides aminés polaires. Les résidus chargés négativement sont localisés principalement à l'extrémité N-terminale de la protéine alors que le reste de la protéine est chargé positivement. A pH neutre, la charge globale de la protéine htau40 est de +2 et son point isoélectrique de 8,6 bien que cela cache le fait que tau est avant tout une protéine composée de plusieurs domaines dont la

charge nette de chacun est différente. Enfin, d'une façon générale la protéine htau40 possède une faible hydrophobicité.

A. Conditions de fibrillation *in vitro*

Jeganathan et al⁷⁰ ont effectué des travaux sur les facteurs (pH, la force ionique et la température) influençant la structure en solution de la protéine tau et de ses mutants K18, K19 ainsi que leurs effets sur l'agrégation en fibres. La structure de ces mutants est rappelée ci-dessous (Fig. 111). Dans ces travaux, les fibres sont formées en présence d'héparine sauf pour le mutant K18ΔK280 qui peut former des fibres sans inducteur polyanionique.

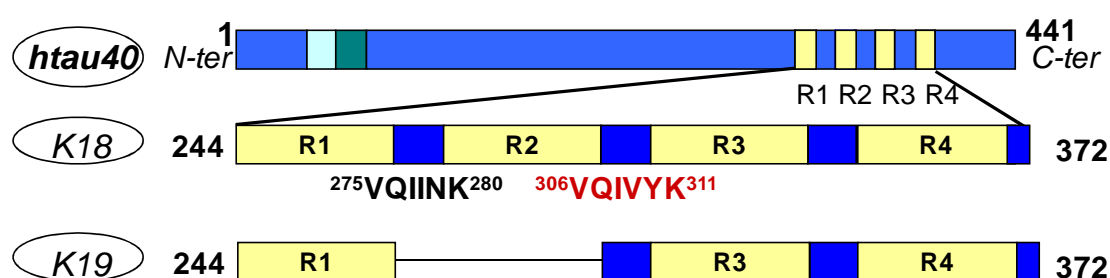


Fig. 111. Structure des mutants de la protéine tau

Les résultats obtenus par cette équipe sont présentés dans le tableau ci-après (Tabl. 17-). La protéine tau et ses mutants, quelles que soient les conditions testées, possèdent des structures désordonnées en solution. Contrairement aux autres protéines désordonnées la diminution de la charge nette de la protéine tau n'influence pas son degré de structuration. Ce comportement peut s'expliquer d'une part par le fait qu'elle possède plusieurs domaines dont chacun a une charge nette qui lui est propre, et d'autre part par sa faible hydrophobicité.

Tabl. 17- Etude des facteurs influençant la fibrillation de tau et de ses mutants (K18, K19 et K18ΔK280)

Paramètres testés	Structure de tau et de ses mutants en solution (sans héparine)	Fibrillation des mutants de tau (avec héparine)	Stabilité des PHF préformés avec les mutants
pH	Pas influence (Random coil quelque soit le pH)	K18 et K19 : faible à pH<5 et pH>10, modérée à pH 6-7, élevée à pH 8-10	K18 et K19 : stables pour pH 6- 9 K18ΔK280 : stables pour toutes les valeurs de pH
Température (T)	Pas influence	K18 et K19 : évolution en cloche avec une T optimale à 50 °C, pas de fibrillation pour T>60 °C	Stables
Force ionique (Fi)	Pas influence	K18 et K19 : Augmentation de la Fi diminue la fibrillation (nulle si [NaCl]>0,1 M)	Stables
Polarité du solvant	Pas influence		Stables
Fluorescence (ThS)	Pas de fluorescence	K18 et K19 : forte augmentation de la fluorescence au cours de la fibrillation (plus faible pour K18 vs K19)	
Dénaturation (GdnHCl)			K18 et K19 : forte dénaturation à partir de [GdnHCL]=0.5 et 1 M) K18ΔK280 : plus stable, dénaturation pour [GdnHCL]>4 M

L'agrégation des mutants K18 et K19 est optimale pour des pH situés juste en dessous de leur point isoélectrique. Ceci s'expliquerait par la réduction de leurs charges nettes favorisant les interactions tau/héparine, l'héparine neutralisant le reste des charges. La diminution de l'agrégation lorsque la force ionique augmente déstabiliserait les interactions ioniques tau-tau ou tau-héparine. La température optimale de 50 °C pour la fibrillation favoriserait la formation de ponts salins et des interactions hydrophobes. Enfin, l'augmentation de fluorescence de la ThS lors de la fibrillation indique la formation de structures en feuillets β -croisés . En effet, la ThS émet de la fluorescence à 520 nm lorsqu'elle se lie à des structures en feuillets β -croisés. L'augmentation de la fluorescence est plus rapide et plus forte lors de la fibrillation de K18, ce qui indique que la présence de R2 favorise la structuration en feuillets β -croisés. La fibrillation de la protéine tau entière provoque une faible augmentation de la fluorescence, probablement à cause de l'enfouissement du cœur hydrophobe dans les fibres. Il a également été établi que des poches hydrophobes sont formées au cours du processus.

La destruction des PHF préformés en présence de dénaturant est corrélée à la perte des structures en feuillets β et des poches hydrophobes. La concentration en

dénaturant nécessaire pour détruire les fibres des mutants K18 et K18ΔK280 est supérieure à celle nécessaire pour la déstabilisation des fibres de K19. De plus, l'instabilité des PHF pour des valeurs extrêmes de pH met en avant l'importance de la formation de ponts salins qui permettent la formation des fibres. Tout indique que le motif R2 augmente la propension à former des feuillets β et des poches hydrophobes ce qui permet de stabiliser les fibres, notamment en compensant la perte de ponts salins à certaines valeurs de pH.

Ces résultats confirment que la région des motifs de liaison aux microtubules est au cœur de la fibrillation de la protéine tau et qu'elle est le site de la formation de structures en feuillets β . De plus, ils indiquent que la fibrillation est aussi conduite par des interactions ioniques notamment par la formation de ponts salins.

B. Milieu oxydant/réducteur : formation de ponts disulfures

L'équipe de Mandelkow^{56,70} a testé l'influence de la formation de ponts disulfures sur la fibrillation des mutants K18 et K19 en présence d'héparine. En effet le mutant K18 possède deux cystéines, C291 et C322 présentent dans les motifs R2 et R3 respectivement, tandis que K19 n'en possède qu'une (C322). La fibrillation des mutants ne possédant qu'une cystéine (K18-C322A ou K18-C291A, où la cystéine est mutée par une alanine) ou aucune (K18-C322A-C291A et K19-C322A) a également été étudiée. La fibrillation est accélérée par la formation de ponts disulfures pour les mutants possédant une seule cystéine. Cependant, leur formation n'est pas indispensable car la fibrillation est seulement retardée en milieu réducteur (en présence de DTT). En revanche, la fibrillation du mutant K18 est accélérée en milieu réducteur. Ceci peut se traduire par la formation de ponts disulfures intramoléculaires (formation de « monomères compacts ») qui empêcherait les monomères de se structurer en espèces compétentes pour la fibrillation. Dans tous les cas la formation de dimères est observée, bien qu'ils soient présents en plus faible quantité en milieu réducteur, ce qui est en accord avec différents travaux proposant la formation de dimères lors de l'étape de nucléation. Ces dimères pourraient donc se former *via* des ponts disulfures mais aussi par l'intermédiaire d'interactions ioniques et hydrophobes (Fig. 112).

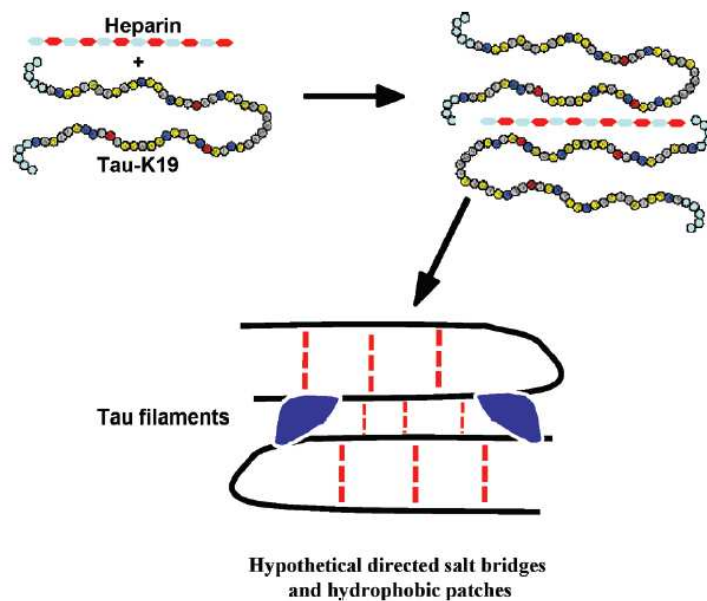


Fig. 112. Formation de dimères de tau lors de la nucléation⁷⁰

C. Inducteurs de la fibrillation : acide arachidonique et héparine

La fibrillation de tau *in vitro* nécessite l'addition de cofacteurs chargés négativement, par exemple, des inducteurs polyanioniques ou des acides gras dont les plus fréquemment utilisés sont l'héparine et l'acide arachidonique (AA). Les fibres obtenues dans ces conditions correspondent à des PHF ou des filaments droits similaires à ceux retrouvés dans les tissus extraits de cerveaux humains atteints d'Alzheimer⁵⁶. Ces cofacteurs permettraient non seulement de compenser les charges positives de tau permettant la formation de structures en feuillets β mais aussi de diminuer la barrière énergétique d'induction de la nucléation conduisant à la formation des fibres.

L'AA induit la formation des fibres par formation de micelles qui exposent des charges négatives à leur surface. Ces micelles anioniques induiraient la formation de filaments en concentrant localement des monomères de protéine tau et/ou en stabilisant la formation d'assemblages possédant une conformation compétente pour la fibrillation. Contrairement à ce qu'il a été observé en présence d'héparine, l'oxydation, c'est-à-dire la formation de ponts disulfures, en présence d'AA influence peu la cinétique de fibrillation⁵⁶. Ainsi, lorsque l'AA est utilisé comme inducteur de la fibrillation la formation de dimères influence peu la fibrillation par rapport à la formation de micelles qui permettent dans ces conditions d'induire la nucléation. Enfin, la morphologie des fibres obtenues n'est pas la même en présence d'AA pour les différentes isoformes de la protéine (htau23 et htau40) ou mutants utilisés. Mandelkow et col.⁵⁶ ont observé que les fibres obtenues à partir de l'isoforme htau23 ou du mutant K19 (tous deux ne possédant pas le motif de répétition R2) forment des fibres enroulées en conditions oxydantes et

des fibres droites en milieu réducteur. L'isoforme htau40 et les mutants K18 et K18ΔK280 (possédant le motif R2) forment des fibres droites quelque soit le milieu utilisé. De la même manière King et al²⁵⁶ ont mis en évidence que la morphologie des fibres et la cinétique de leur formation diffèrent pour les différentes isoformes de tau en conditions réductrices et en présence d'AA.

Le mécanisme de formation de fibres en présence d'héparine a aussi été très étudié. Comme nous l'avons énoncé auparavant, les conditions oxydantes et réductrices influencent la cinétique de formation des fibres en présence d'héparine ce qui suggère dans ce cas la formation de dimères de tau pour induire la nucléation⁵⁶. La morphologie des fibres obtenues en présence de cet inducteur est différente pour les isoformes et mutants ne possédant pas le motif R2 (fibres enroulées) et le possédant (fibres droites) mais ne change pas selon que le milieu soit oxydant ou réducteur⁵⁶.

Récemment Elbaum-Garfinkle et al ont proposé un modèle de l'interaction tau-héparine²⁵⁷ (Fig. 113). La liaison de l'héparine entraîne des pertes de contacts entre les extrémités C- et N-terminales ainsi qu'entre les extrémités et les domaines de liaison aux microtubules. Cela induirait une conformation permettant la fibrillation par la compaction des motifs de répétition R1 à R4 entre eux.

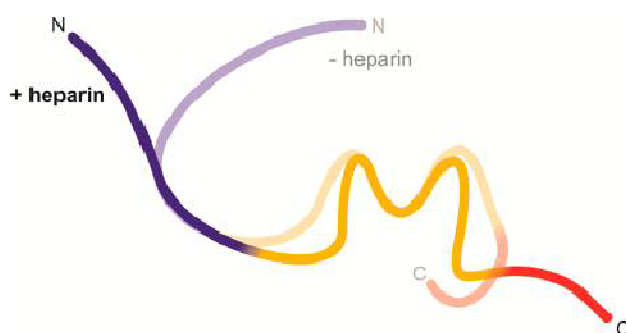


Fig. 113. Modèle de liaison de l'héparine avec la protéine tau²⁵⁷ (Domaine de projection N-terminal en bleu, domaine de liaison aux microtubules en jaune et extrémité C-terminale en rouge. En gras : tau en présence d'héparine, en transparent sans héparine)

L'interaction de l'héparine avec la protéine a également été suivie par RMN par l'équipe de Lippens²⁵⁸. Les auteurs ont ainsi établi que l'héparine se lie aux résidus R2 et R3 avec une affinité de l'ordre du micromolaire. Il existe deux fortes zones d'interaction

256.King, M. E.; Ahuja, V.; Binder, L. I.; Kuret, J., Ligand-dependent tau filament formation: implications for Alzheimer's disease progression. *Biochemistry* **1999**, 38 (45), 14851-14859.

257.Elbaum-Garfinkle, S.; Rhoades, E., Identification of an Aggregation-Prone Structure of Tau. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (40), 16607-16613.

258.Sibille, N.; Sillen, A.; Leroy, A.; Wieruszeski, J.-M.; Mulloy, B.; Landrieu, I.; Lippens, G., Structural Impact of Heparin Binding to Full-Length Tau As Studied by NMR Spectroscopy†. *Biochemistry* **2006**, 45 (41), 12560-12572.

entre l'héparine et les régions chargées positivement autour des motifs de liaison aux microtubules (zone riche en proline et en amont de R4). Les régions chargées positivement seraient neutralisées par l'hyperphosphorylation entraînant l'agrégation de la protéine tau. Enfin, ces études RMN démontrent que l'interaction avec l'héparine permet la formation de structures en feuillets β dans plusieurs régions qui permettrait la nucléation pour l'agrégation de tau. Après la formation de filaments, les déplacements chimiques de l'héparine disparaissent, ce qui indiquerait que l'héparine serait présente dans le cœur des PHF et permettrait un empilement parallèle des régions des motifs R1 à R4 probablement en compensant les charges positives des zones riches en lysines.

III.1.1.2. Structure des fibres de tau

Il est maintenant largement accepté que le cœur des PHF est formé par les motifs de répétition de liaison aux microtubules (R1 à R4). La formation de structures en brins β a également été mise en évidence dans cette région. Ces structures impliqueraient en particulier les motifs PHF6* ($^{275}\text{VQIINK}^{280}$) et PHF6 ($^{306}\text{VQIVYK}^{311}$), présents respectivement dans les motifs R2 et R3. La structure des fibres a été étudiée par RMN par plusieurs équipes, dont deux études ont été effectuées par la même équipe et seront détaillées ici. La première a été réalisée pour les fibres formées par le mutant K19 par RMN du solide (SS-NMR)²⁵⁹. Elle a permis d'identifier trois brins β dans les motifs R1 (le plus court, β 1 résidus 262-267), R3 (β R3' et β R3, résidus 307-328 excepté Pro 312) et R4 (β R4' et β R4, résidus 336-354). Les brins β et β' correspondent à deux jeux de déplacements chimiques représentant deux structures distinctes. La partie rigide constituant le cœur des PHF est composée du motif R3 et est entourée des motifs R1 et R4 qui sont exposés au solvant. Le motif R3 contient la séquence VQIVYK connue pour s'assembler en feuillets β . Les feuillets β R1- β R3 et β R3- β R4 sont reliés par des séquences PGGG qui correspondent à des boucles ou des tours d'après les données obtenues en SS-NMR. Il faut noter que la présence de plusieurs structures empêche la détermination de l'arrangement exacte des structures. Ainsi, les déplacements chimiques pour le feuillet β 4 ne sont pas attribués avec certitude.

La seconde étude, également effectuée en RMN du solide avec le mutant K19 et en solution par échange deutérium/hydrogène pour les mutants K18 et K19, permet

259. Andronesi, O. C.; Bergen, M. v.; Biernat, J.; Seidel, K.; Griesinger, C.; Mandelkow, E.; Baldus, M., Characterization of Alzheimer's-like Paired Helical Filaments from the Core Domain of Tau Protein Using Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (18), 5922-5928.

d'obtenir des données plus fines sur le cœur rigide des PHF²⁶⁰. Comme précédemment, les données de SS-RMN indiquent que le cœur rigide des PHF est constitué principalement du motif R3 tandis que les motifs R1 et R4 sont plus flexibles. Ceci est confirmé par l'étude RMN dans le D₂O : les protons du motif R3 pour K19 sont les moins exposés au solvant et donc les plus protégés. Pour K18 le même résultat est obtenu pour le motif R2 ce qui indique que ce motif, et plus particulièrement sa séquence VQIINK, serait impliqué dans le cœur rigide des PHF de K18. Sur les 99 acides aminés constituant le mutant K19, 18 résidus (dans la séquence de V306 à S324) ont été attribués précisément dans le motif R3. Cependant deux sortes de résonances sont obtenues pour les résidus K321 à S324 indiquant deux conformations possibles au niveau de cette séquence. Le cœur de la fibre possède une conformation prédominante en feuillets β (Fig. 114), sauf pour certains résidus.

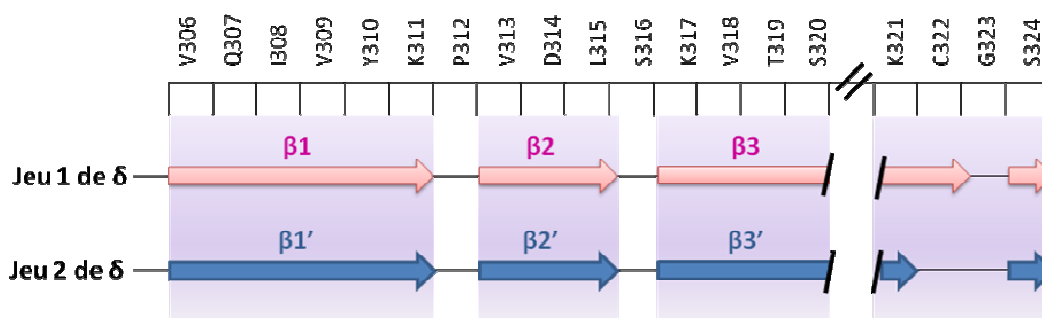


Fig. 114. Brins β attribués dans le motif R3²⁶⁰ (δ = déplacement chimique)

Ces résidus possèdent deux jeux de déplacements chimiques correspondant à des arrangements structuraux différents : P312, S316, G323 pour le premier jeu et C322 et G323 pour le second jeu. Ces résidus forment des nœuds qui détruisent la conformation en feuillets β . Trois feuillets β sont présents dans la séquence V306-S324 dont le troisième diffère selon les deux jeux de déplacements chimiques (avec ou sans C322). En amont les déplacements chimiques de la S324, pour les deux jeux de déplacements chimiques indiquent la formation d'un autre feuillet β mais l'attribution est incertaine. Les auteurs ont ainsi proposé deux types d'arrangement des feuillets β_3 et β_3' (Fig. 115) : (i) avec des ponts disulfures intermoléculaires dans un protofilament s'étendant le long de l'axe de la fibre où les monomères sont placés en parallèle (ii) avec des ponts disulfures intermoléculaires formés entre des monomères disposés dans une symétrie différente (en antiparallèle) dans un protofilament où des dimères latéraux s'étendent le long de l'axe de la fibre.

260.Daebel, V.; Chinnathambi, S.; Biernat, J.; Schwalbe, M.; Habenstein, B.; Loquet, A.; Akoury, E.; Tepper, K.; Müller, H.; Baldus, M.; Griesinger, C.; Zweckstetter, M.; Mandelkow, E.; Vijayan, V.; Lange, A., β -Sheet Core of Tau Paired Helical Filaments Revealed by Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (34), 13982-13989.

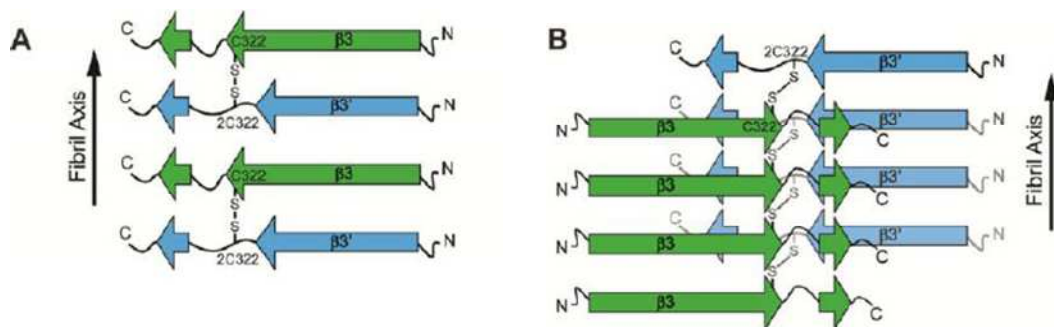


Fig. 115. Arrangements structuraux proposés pour le feuillet β_3 de la protéine tau²⁶⁰

Enfin, ces résultats sont supportés par la disparition de la capacité de K19 à former des fibres lorsque des mutations ponctuelles de résidus par des prolines sont effectuées dans les trois feuillets β . De la même manière, la mutation de résidus hydrophobes par des résidus polaires dans ces régions diminue fortement, voire empêche l'agrégation de K19. Ceci souligne l'importance des interactions hydrophobes dans la stabilisation de la structure des fibres de tau.

III.2. Conception des mimes de tau

III.2.1. Identification des séquences par modélisation moléculaire

Bien que la structure des fibres de tau ait été étudiée par plusieurs équipes, elle n'est pas totalement élucidée à ce jour. Cette protéine peut subir une protéolyse *in vivo* conduisant à la coupure de ses extrémités C- et N-terminales qui conduit à un cœur des fibres constitué principalement des motifs de répétition de liaison aux microtubules flanqués de séquences peptidiques résiduelles en aval et amont de cette région. Cependant du fait de la rigidité et de l'insolubilité de la structure produite (DNF), l'étude structurale est difficile. Les techniques de caractérisation classiques en solution sont impossibles (RMN en solution) et les DNF ne sont pas cristallisables. De plus, les six isoformes de la protéine tau sont trop longues pour être produites par synthèse chimique. L'équipe de Mandelkow a largement contribué à la compréhension de la fibrillation de cette protéine. En effet, Mandelkow et col. ont démontré que des mutants constitués principalement des motifs de liaison aux microtubules (R1 à R4) peuvent former des fibres similaires à celles produites par les isoformes de la protéine native⁷⁰. Cette région de la protéine constituerait donc le cœur des agrégats formés par la protéine tau. Certaines séquences (PHF6 ou VQIVYK et PHF6* ou VQIINK) des motifs de répétition de liaison aux microtubules ont été identifiées comme essentielles pour la fibrillation de la fibrillation^{67,68}. Enfin récemment, cette même équipe a résolu une partie de la structure des PHF par RMN du solide (ssNMR) en montrant que la partie rigide constituant le cœur

des PHF se situe dans le motif R3 des motifs de répétition de liaison aux microtubules et contient des structures en feuillets β -croisés^{259,260}.

C'est pourquoi le développement d'un mme des fibres de la protéine tau pouvant être synthétisé chimiquement, reproduisant des fibres semblables à celles de la protéine native et permettant des tests de fibrillation et d'inhibition *in vitro* plus accessibles expérimentalement, nous a semblé attrayant. Pour cela nous avons cherché à sélectionner une partie de la séquence de la protéine tau suffisante pour reproduire des fibres. Bien que des publications aient démontré que la séquence tau₃₀₆₋₃₁₁ ou VQIVYK pouvait former des fibres, nous voulions reproduire un modèle plus étendu des fibres de la protéine tau. Pour cela, nous avons cherché à visualiser par modélisation moléculaire les interactions possibles du motif R3 avec les séquences environnantes. D'après les études de l'équipe de Mandelkow^{259,260} le motif R3 contenant la séquence VQIVYK devait être la structure de base de notre modèle. Le fragment le plus long contenant cette séquence et la cystéine 322, dont le rôle dans la fibrillation est toujours discuté, correspondait à la séquence tau₃₀₆₋₃₂₃. Comme nous souhaitions lier cette séquence à un châssis moléculaire un bras espaceur (GGGK) a été ajouté (séquence **A**, Fig. 116).

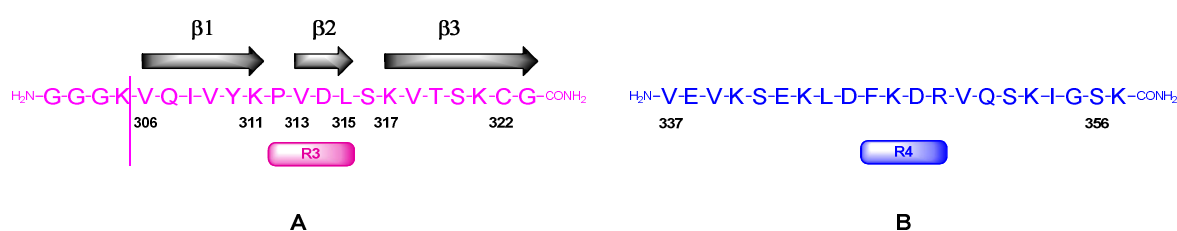


Fig. 116. Schéma des brins peptidiques sélectionnés

Nous avons supposé qu'une autre séquence peptidique de la protéine pourrait interagir avec ce fragment. La séquence R2 n'étant pas systématiquement présente dans toutes les isoformes de la protéine, nous avons choisi de visualiser l'interaction du motif R4 avec le fragment R3 sélectionné. La séquence de ce motif permettant de former un cœur hydrophobe et des ponts salins nécessaires pour la fibrillation correspondent à la séquence **B** (Fig. 116).

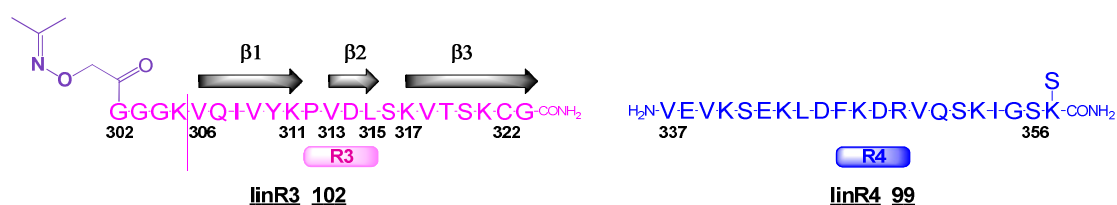
Les séquences **A** et **B** ont été étudiées séparément et en mélange dans des tests de fibrillation *in vitro* suivis par émission de fluorescence de la ThT ou de la ThS. Ces peptides ont également été liés en deux exemplaires sur un châssis moléculaire dicétopiperazine afin d'augmenter leur concentration locale et faciliter la formation des fibres.

III.2.2. Stratégie de synthèse

L'étude de la fibrillation des séquences peptidiques **A** et **B** sélectionnées par modélisation moléculaire (Fig. 116) a été envisagée en utilisant les peptides seuls ou liés sur le châssis moléculaire dicétopiperazine. L'utilisation de ce châssis permet de pré-organiser les peptides dans l'espace. La DCP comportant une chaîne aminoalkyle à six carbones dans le plan de son cycle (D6C) a été choisie et la liaison des peptides est réalisée par formation d'un lien éther d'oxime.

D'une façon générale la liaison d'un peptide à un châssis par lien éther d'oxime s'effectue selon deux stratégies possibles : DCP(oxyamines) et peptide(aldéhyde) ou DCP(aldéhydes) et peptide(oxyamine) (Fig. 117). Cette stratégie permet de coupler facilement les peptides par leurs extrémités N- ou C-terminales selon notre besoin. La fonctionnalisation à l'extrémité N-terminale est facilement réalisée soit par couplage d'un ester activé introduisant la fonction oxyamine soit par couplage d'une sérine masquant une fonction aldéhyde. La fonction 1,2-aminoalcool de celle-ci doit être libre pour subir une coupure oxydante par le périodate de sodium entraînant la formation d'un aldéhyde. La fonctionnalisation à l'extrémité C-terminale est effectuée par l'incorporation d'une lysine dont la chaîne latérale a été modifiée au préalable pour introduire les fonctions oxyamine et aldéhyde.

(A) Peptides linéaires



(B) Assemblages D6C

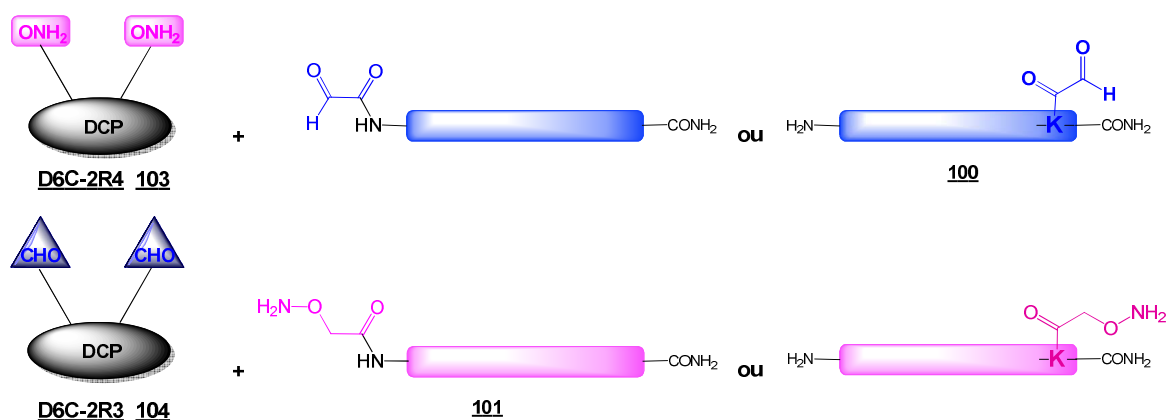


Fig. 117. Stratégie de synthèse

Dans un premier temps la séquence peptidique **A** est fonctionnalisée à son extrémité N-terminale par une fonction oxyamine (peptide **101**, Fig. 117). Cette séquence contient une cystéine ce qui rend difficile l'introduction d'une fonction aldéhyde *via* une sérine. Afin d'être étudié seul, l'oxyamine du peptide **101** est capturée par l'acétone (peptide **102** ou **linR3**, Fig. 117). La **D6C-2R3** correspond à la DCP présentant deux séquences **A**. Elle est obtenue par couplage de deux peptides **101** sur le châssis D6C portant deux fonctions aldéhyde (D6C **98**).

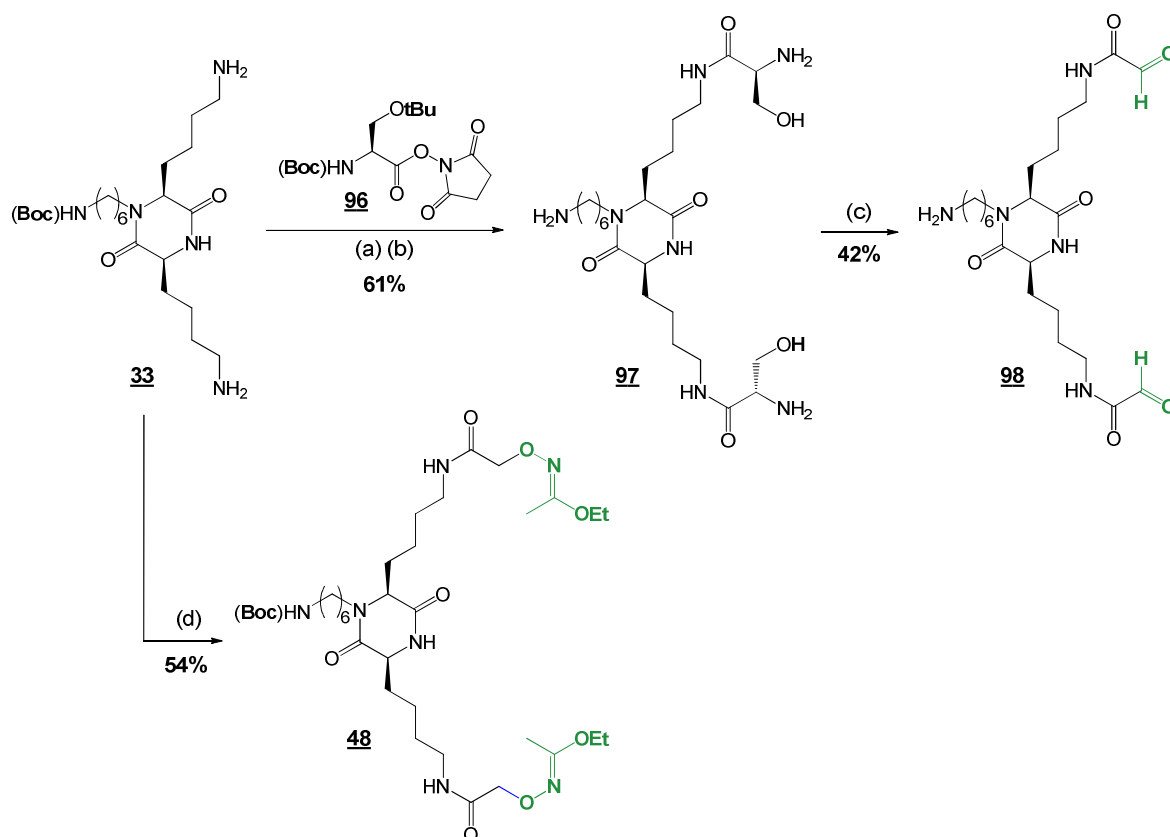
La séquence **B** est fonctionnalisée par une fonction aldéhyde à son extrémité C-terminale (peptide **100**, Fig. 117). L'étude du peptide seul est réalisée avec le peptide **99** (ou **linR4**) dont la sérine n'est pas oxydée (Fig. 117). Le couplage de deux peptides **100** sur le châssis D6C portant deux fonctions oxyamines (D6C **48**, paragraphe II.2.2.2) conduit à la **D6C-2R4** (ou **103**).

Les extrémités C-terminales des peptides sont sous forme amide afin de les rendre moins sensibles à la protéolyse et de minimiser les interactions entre les charges négatives des extrémités C-terminales.

III.2.3. Synthèse des mimes

III.2.3.1. Synthèse des châssis D6C

Des fonctions oxyamine et aldéhyde ont été introduites sur les chaînes latérales des lysines des châssis D6C (Fig. 118). La synthèse de la D6C-Boc/2Acm **48** présentant deux fonctions oxyamine protégées par des groupes acétimide a été décrite précédemment (paragraphe II.2.2.2). Ce châssis ainsi que la D6C-NH₂/2CHO (présentant deux fonctions aldéhyde) sont obtenus à partir de la D6C-Boc/2NH₂ **33** (Fig. 118). L'ester activé de la (Boc)Ser(tBu)-OH **96** est couplé sur les fonctions amine de la D6C **33** pour donner la D6C-Boc/2(Boc)Ser(tBu) après purification sur gel de silice. Les fonctions de la DCP sont déprotégées en milieu acide pour donner la D6C-NH₂/2Ser **97** sans étape de purification supplémentaire avec 61% de rendement (calculé sur deux étapes). Les fonctions aldéhyde de la D6C-NH₂/2CHO **98** sont obtenues après coupure oxydante des fonctions 1,2-aminoalcool par action du périodate de sodium. La réaction n'est pas totale lorsqu'elle est faite dans l'eau à pH acide ce qui laisse supposer que la D6C-NH₂/2Ser **97** est peu soluble dans ce milieu. L'ajout d'acétonitrile est nécessaire pour avoir un bon taux de conversion en aldéhyde. Ainsi la D6C-NH₂/2CHO **98** a été obtenue après purification par CLHP préparative avec un rendement de 42%. Sa caractérisation a été réalisée par spectrométrie de masse.

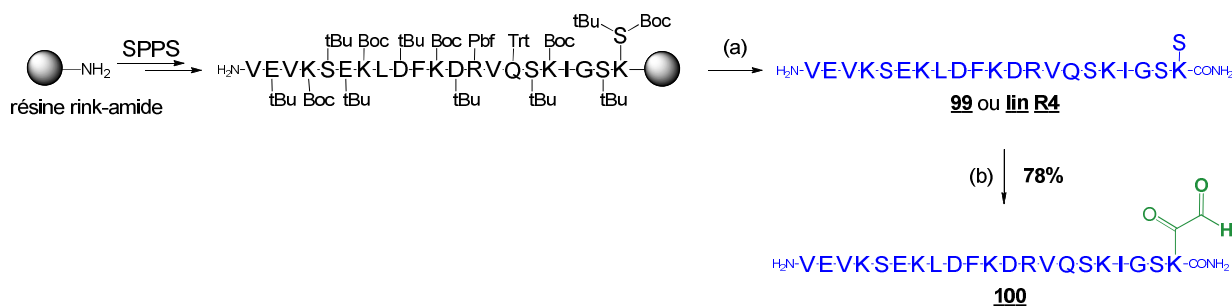


Réactifs : (a) **96**, DIEA, DCM (b) TFA/DCM (1:1) (c) NaIO₄, CH₃CN/H₂O acidifiée avec 0,1% de TFA (3:2) (d) **43**, DMF, DIEA

Fig. 118. Schéma de synthèse de la DCP bis-aldéhyde **98**

III.2.3.2. Synthèse des synthons peptidiques

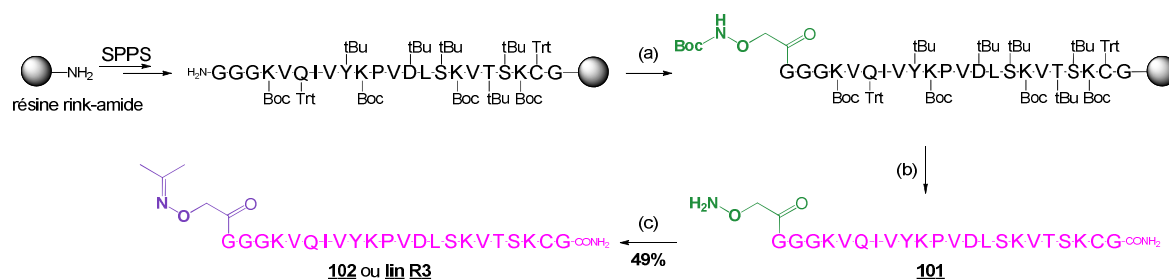
La première séquence peptidique est obtenue par SPPS automatisée sur résine Rink amide (Fig. 119). La sérine est introduite sur support à l'extrémité C-terminale du premier peptide *via* une lysine modifiée sur son amine en ϵ sur laquelle a été couplée préalablement une Boc-Ser(tBu)-OH. Le peptide **99** est obtenu après coupure de la résine en milieu acide fort suivie d'une étape de purification par CLHP préparative. Ce peptide sera utilisé dans les études biologiques et structurales. Le peptide aldéhyde **100** est synthétisé suite à la coupure oxydante de la fonction aminoalcool du peptide **99** par le périodate de sodium en milieu aqueux acide. Le peptide **100** est obtenu avec 78% de rendement après purification par CLHP préparative. Cependant la caractérisation par spectrométrie de masse ne correspond pas à la masse attendue mais à un composé avec une masse égale à celle calculée plus 147 g/mol. Malgré cela, en présence de la D6C **48** portant deux oxyamines, le lien éther d'oxime est formé et donne lieu à un composé bien caractérisé en spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5) (b) NaIO₄, H₂O

Fig. 119. Schéma de synthèse du peptide linR4

La seconde séquence peptidique (lin R3) est également synthétisée par SPPS automatisée sur résine Rink amide (Fig. 120). La fonction oxyamine protégée par un groupement Boc est introduite par couplage de son ester activé 72 avec la fonction N-terminale du peptide sur résine. Le peptide totalement déprotégé 101 est obtenu après coupure de la résine en milieu acide suivie d'une étape de purification par CLHP préparative. Sa caractérisation est effectuée par spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) 72, DMF, DIEA (b) TFA/TIS/H₂O/MeONH₂ (95:3:2:2) (c) Acétone, H₂O acidifiée avec 0,1% de TFA, 37 °C

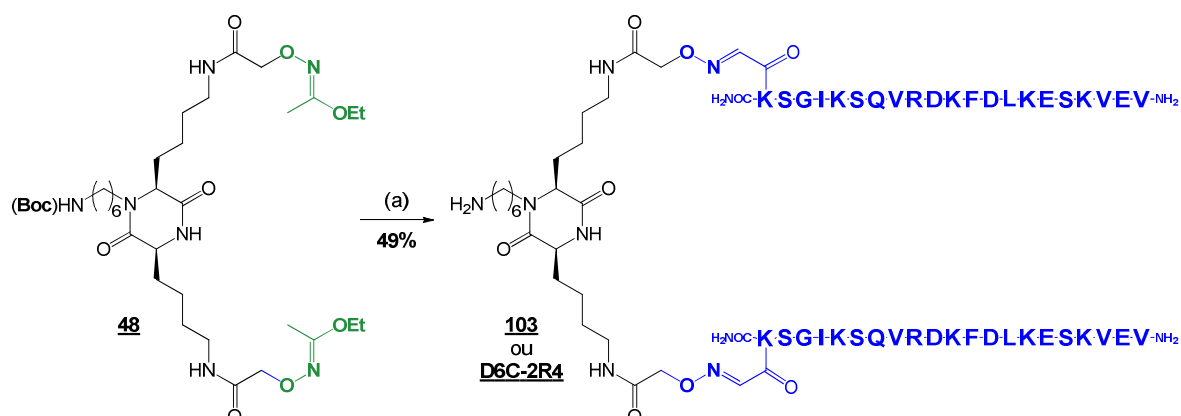
Fig. 120. Schéma de synthèse du peptide linR3

Le peptide linéaire 102 (linR3) est utilisé pour les études biologiques et structurales. Pour cela la fonction oxyamine du peptide 101 est piégée sous forme d'oxime par réaction avec l'acétone (Fig. 120). Ainsi, le peptide 102 est synthétisé avec 49% de rendement après purification par CLHP préparative. Ce produit est caractérisé en spectrométrie de masse.

III.2.3.3. Synthèse des assemblages D6C

La séquence peptidique R4 100 portant une fonction aldéhyde est couplée sur la D6C-Boc/2Acm 48 présentant deux oxyamines protégées par des groupes acétimidates (dont la synthèse est décrite dans le paragraphe II.2.2.2) en milieu acide (Fig. 121). La D6C-2R4 103 portant deux « séquences R₄ » est obtenue après purification par CLHP

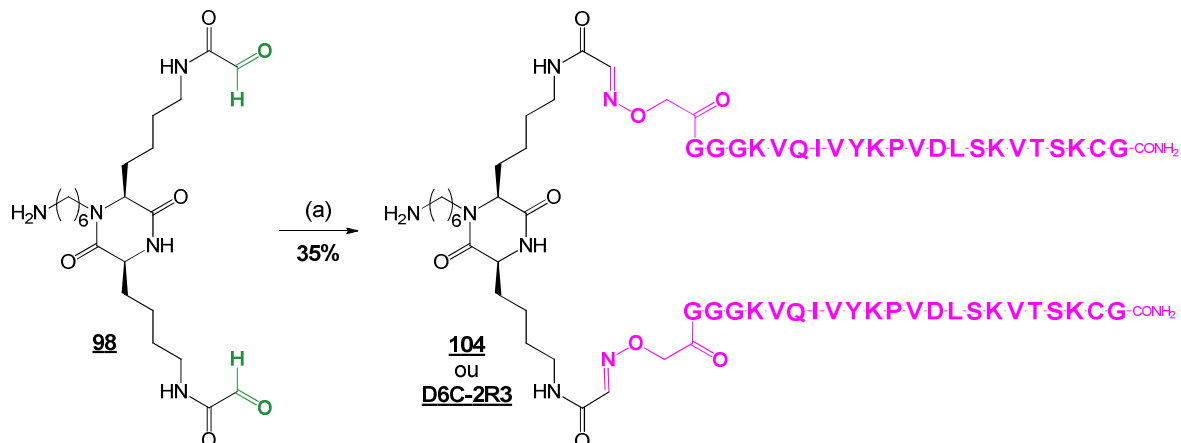
préparative avec un rendement de 49%. L'assemblage est caractérisé en spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) 100, H₂O/TFA (1:1), 37 °C

Fig. 121. Schéma de synthèse de la D6C-2R4

La séquence peptidique R3 101 est couplée par lien éther d'oxime sur la D6C-NH₂/2CHO 98 en milieu acide (Fig. 122). La D6C-2R4 104 est ainsi synthétisée après purification par CLHP préparative avec un rendement de 35%. La caractérisation de ce produit a été réalisée par spectrométrie de masse.



Réactifs : (a) 101, H₂O/TFA (1:1), 37 °C

Fig. 122. Schéma de synthèse de la D6C-2R3

III.3. Caractérisation des structures formées

Dans un premier temps nous avons testé la capacité des peptides linéaires lin R3 (102) et linR4 (99) et des assemblages D6C-2R3 (104) et D6C-2R4 (103) à former des fibres *in vitro*. Pour cela nous avons utilisé un test de suivi par fluorescence (ThT, ThS), le dichroïsme circulaire et la microscopie à force atomique (AFM).

III.3.1. Principe des tests et méthodes de caractérisation

La fibrillation de la protéine tau native est suivie par le déplacement d'émission de fluorescence de la ThT et de la ThS. Le déplacement d'émission de la fluorescence de ces colorants est en général causé par leur fixation à des structures en feuillets β croisés. Contrairement aux fibres formées par l'A β , les fibres de tau se fixent peu à la ThT et au rouge Congo et la fibrillation de la protéine est le plus souvent suivie avec la ThS. En effet les fibres de tau sont pauvres en feuillets β croisés qui sont enfouis à l'intérieur de la fibre. Cependant une structure plus courte et plus riche en feuillets β croisés devrait bien interagir avec les fluorophores ThT et ThS. C'est pourquoi nous avons choisi de les utiliser pour tester la fibrillation de nos mimes sur microplaque. Le principe de ce test est le même que celui réalisé dans le chapitre précédent et est résumé en Fig. 123. Cependant si la ThT et la ThS réagissent avec des structures en feuillets β , ceci n'indique pas forcément la formation de fibres de types amyloïde. Des études complémentaires en microscopie et dichroïsme circulaire sont nécessaires.

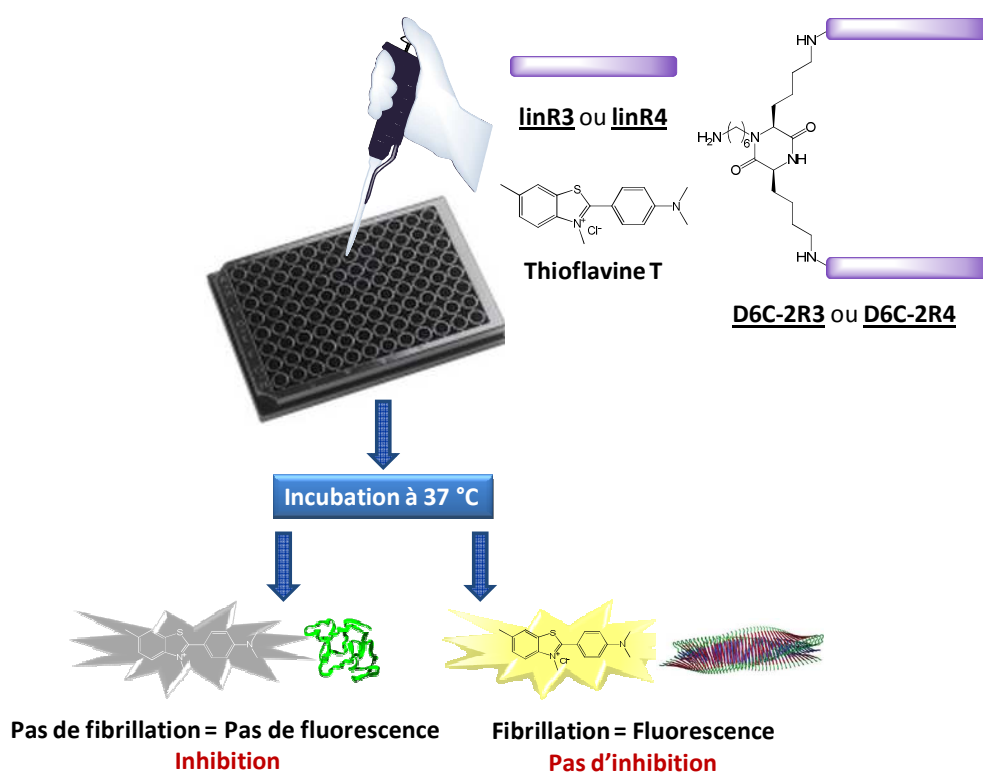


Fig. 123. Principe du test sur microplaque suivi par le déplacement d'émission de fluorescence de la thioflavine

Le dichroïsme circulaire permet de détecter la présence de structures secondaires (feuillet β , hélice α) ou leur absence (structure désordonnée ou random coil) dans un échantillon en solution. La microscopie à force atomique (ou AFM) permet d'observer la morphologie, l'épaisseur et la longueur des structures formées.

III.3.2. Test des conditions de fibrillation

Quatre conditions de fibrillation ont été utilisées. Elles ont été déterminées à partir des conditions connues de fibrillation de la protéine tau qui regroupent en général, un tampon dont le pH est voisin de 7, un inducteur tel que l'héparine qui est le plus communément utilisé, et parfois un agent réducteur, le DTT. La fibrillation de la protéine tau native (htau40) se déroule à 37 °C sur dix à quinze jours en présence d'héparine pour une concentration entre 20 et 50 µM en protéine.

Dans la première de nos conditions (cond. 1), les composés sont dissous uniquement dans du tampon phosphate (Tpn P) à pH 7.4 (50 mM tampon phosphate, 100 mM NaCl). Dans la seconde condition (cond. 2), du DTT (1 mM) est ajouté au milieu. Dans la troisième condition (cond. 3), les composés sont en solution dans le Tpn P avec de l'héparine (ratios 2:1 ou 4:1 composé/hép). La dernière condition (cond. 4) regroupe les mêmes éléments que la précédente et du DTT a été additionné (1 mM). Tous les échantillons contiennent également de la ThT. La manipulation se déroule à 37 °C pour toutes les conditions. Le DTT est ajouté dans les conditions 2 et 4 afin de prévenir la formation de ponts disulfures pour le peptide linR3 et la D6C-2R3 qui possèdent des résidus cystéines.

Les peptides linéaires (linR4 ou linR3) sont testés à une concentration finale de 100 µM. Afin d'étudier l'interaction éventuelle entre ces deux peptides, ils sont mélangés à un ratio molaire 1:1 (50 µM pour chaque peptide) avec une concentration finale égale à celle des peptides seuls, de façon à travailler avec le même nombre d'équivalents. Les DCP présentant deux motifs peptidiques (D6C-2R4 ou D6C-2R3) sont utilisées à une concentration finale de 50 µM (deux fois moindre que celle utilisée pour les peptides seuls) car le châssis permet de présenter deux équivalents de peptides par molécule. Les deux DCP sont également mélangées à un ratio molaire 1:1 avec une concentration finale de 50 µM (soit 25 µM pour chaque DCP). Les résultats obtenus pour les quatre conditions de fibrillation sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tabl. 18-).

Tabl. 18- Résultats obtenus pour les quatre conditions de fibrillation

(+++ forte augmentation de fluorescence (100 000-200 000), ++ bonne augmentation de fluorescence (50 000-100 000), + faible augmentation de fluorescence (<50 000), - pas d'augmentation de la fluorescence, (*) signal de fluorescence stable au cours du temps à partir de t=0, la durée des phases de latence et d'élongation sont également reportées)

Composé	Condition 1 (Tpn P)	Condition 2 (Tpn P, DTT)	Condition 3 (Tpn P, Hép)	Condition 4 (Tpn P, Hép, DTT)
<u>linR4</u> (100 μ M)	-	-	-	-
<u>linR3</u> (100 μ M)	+++ Latence=15 h Elongation=20 h	+++ Latence=15 h Elongation=20 h	++ Pas de latence Elongation=15 h	++ Pas de latence Elongation=15 h
<u>linR3+linR4</u> (50+50 μ M)	+++ Latence=15 h Elongation=20 h	++ Latence=15 h Elongation=20 h	+ Pas de latence Elongation=20 h	+ Pas de latence Elongation=20 h
<u>D6C-2R4</u> (50 μ M)	-	-	-	-
<u>D6C-2R3</u> (50 μ M)	+++ Latence=15 h Elongation=40 h	+++ Latence=20 h Elongation=60 h	+(*) Pas de latence Pas d'élongation	+ Pas de latence Elongation=20 h
<u>D6C-[2R3+2R4]</u> (25+25 μ M)	++ Latence =15 h Elongation=40 h	++ Latence =40 h Elongation=20 h	+(*) Pas de latence Pas d'élongation	+ Pas de latence Elongation=20 h

La Fig. 124 présente les résultats obtenus pour le peptide linéaire linR3 (C=100 μ M) sous forme de courbes où l'évolution de la fluorescence (en unité arbitraire) a été tracée en fonction du temps (en heures). Les écarts type ne sont pas représentés car ils sont trop faibles.

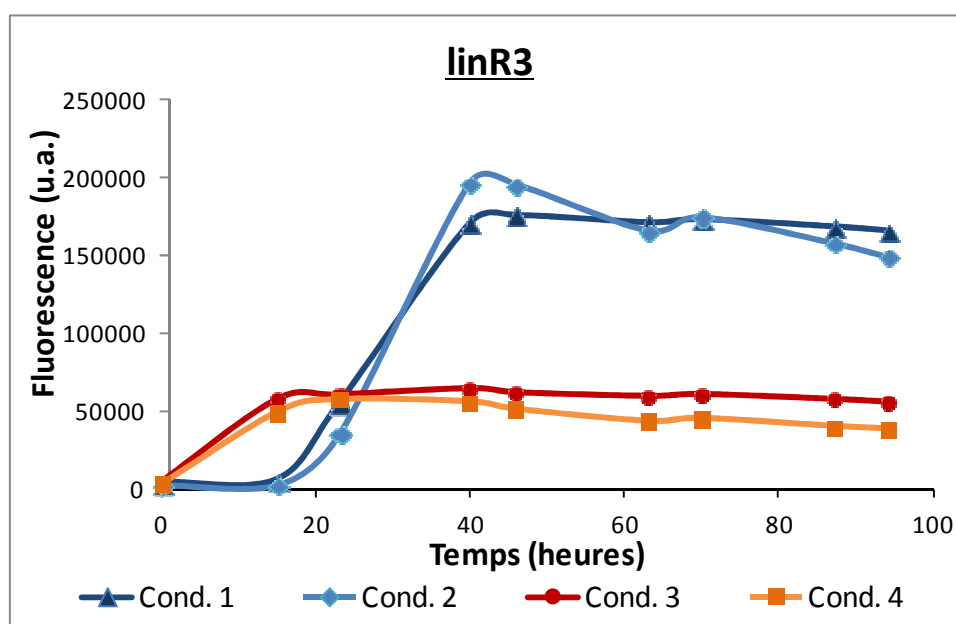


Fig. 124. Evolution de la fluorescence (ThT) au cours du temps pour le peptide linR3

Une forte augmentation de la fluorescence est observée pour le peptide **linR3** (C=100 μ M) en condition 1 (tampon phosphate, pH=7,4 + 100 mM NaCl ou Tpn P) après une phase de latence de 20 h environ. L'ajout de DTT ne semble pas avoir d'influence (condition 2, idem condition 1 + 1 mM DTT). Pour ces conditions, deux courbes sigmoïdales sont obtenues présentant une phase de latence (d'une durée de 20 h) puis une phase d'élongation (d'une durée de 40 h) pour enfin arriver à un plateau. En présence d'héparine (conditions 3 et 4, Tpn P+Hép et Tpn P+Hép+DTT respectivement) le signal de fluorescence est plus faible et aucune phase de latence n'est observée. La formation éventuelle de feuillets β a été confirmée par dichroïsme circulaire (Fig. 125).

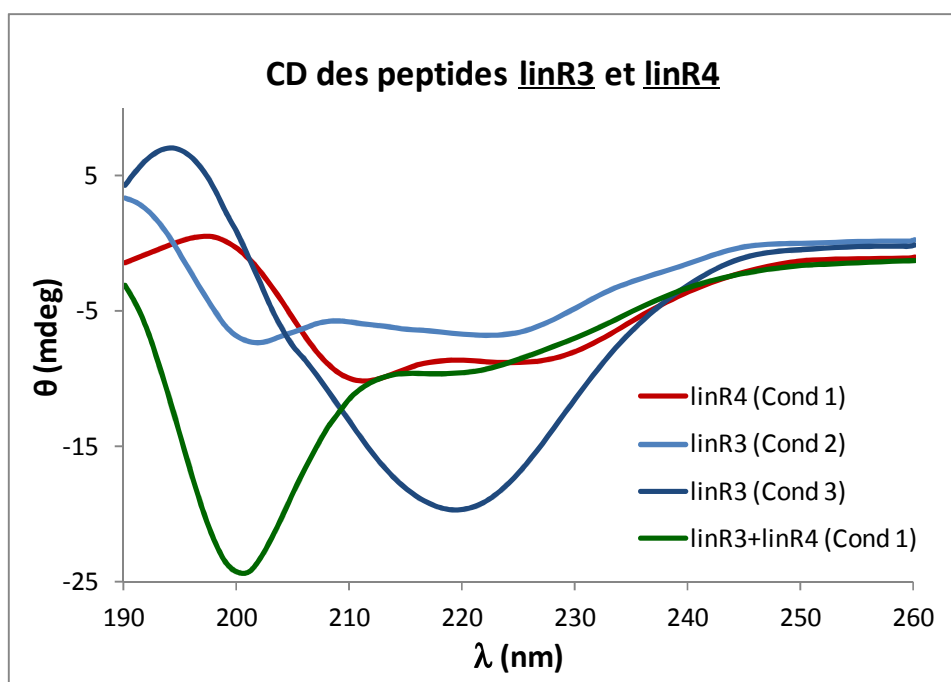


Fig. 125. Dichroïsme circulaire (CD pour circular dichroïsme) des peptides **linR3** et **linR4**

Le peptide **linR3** présente une structure en feuillet β dans la condition 3 (Tpn P et Hép) et une structure partiellement désordonnée et en feuillet β dans la condition 2 (Tpn P et DTT) (Fig. 125). Ceci ne corrèle pas totalement avec les résultats obtenus lors du suivi par fluorescence (un signal plus élevé dans la condition 2). Une hypothèse serait que les feuillets β sont plus enfouis dans les structures formées en condition 3 et donc moins accessibles pour le fluorophore. En effet, l'héparine est utilisée *in vitro* pour accélérer la formation de fibres avec les isoformes de la protéine tau ou ses mutants (K18, K19). La disparition de la phase de latence pour le peptide **linR3** dans les conditions 3 et 4 indique que la formation des structures en feuillets β est accélérée, ce qui est confirmé en dichroïsme circulaire pour la condition 3.

L'incubation du peptide **linR4** (C=100 μ M) dans les différentes conditions testées (pendant environ 7 jours) ne provoque pas d'augmentation de fluorescence. Ceci laisse

supposer qu'aucune structure en feuillets β n'est formée. La mesure en dichroïsme circulaire du peptide dans la condition 1 confirme ce résultat (observation d'une structure en hélice α).

Lorsque les peptides linR4 et linR3 ($C=50 \mu\text{M}$ pour chaque peptide) sont incubés ensemble, un signal plus faible que celui obtenu avec linR3 seul est observé pour toutes les conditions. La diminution du signal peut s'expliquer par les concentrations plus faibles en peptides ($50 \mu\text{M}$) que celles utilisées pour les peptides seuls ($100 \mu\text{M}$). D'une façon générale, les courbes ont la même allure que celles obtenues pour le peptide linR3. La mesure en dichroïsme circulaire du mélange pour la condition 1 indique une structure principalement désordonnée avec une très faible contribution en feuillets β . Les données obtenues ne nous permettent pas de conclure sur l'éventuelle interaction entre les peptides linR3 et linR4. Une étude plus poussée par microscopie est nécessaire.

La Fig. 126 présente les résultats obtenus pour la D6C-2R3. Une forte augmentation de la fluorescence a lieu lorsque la D6C-2R3 ($C=50 \mu\text{M}$) est placée à 37°C dans les conditions 1 et 2 (Tpn P et Tpn P+DTT). La durée de la phase d'élongation est cependant augmentée en présence de DTT (40 h pour la condition 1 et 60 h pour la condition 2). Comme précédemment, l'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible en présence d'héparine (conditions 3 et 4). Dans la condition 3, un signal est observé dès l'ajout de l'héparine ($t=0$) et il n'évolue pas au cours du temps. En présence de DTT (condition 4), aucune phase de latence n'est observée mais une phase d'élongation d'une durée de 20 h a lieu (l'intensité du signal étant légèrement supérieure à celle de la condition 3).

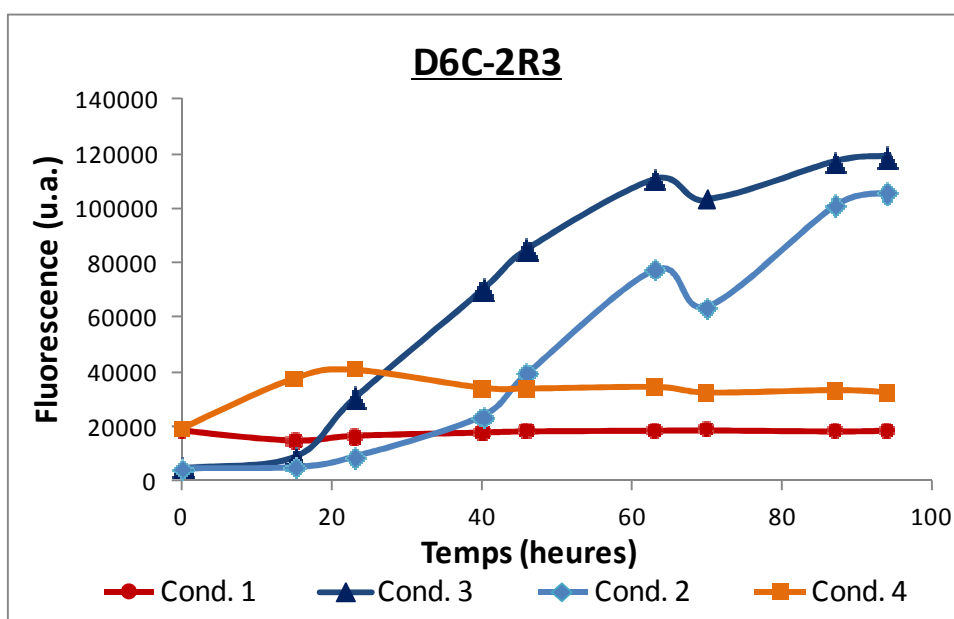


Fig. 126. Evolution de la fluorescence (ThT) au cours du temps pour la D6C-2R3

L'ajout de DTT se traduit par une augmentation du temps d'élongation pour la **D6C-2R3** (conditions 2 et 4). Ceci est en accord avec des observations faites dans la littérature. En effet, dans les tests de fibrillation de tau *in vitro*, la formation de dimères *via* la cystéine 322 permet d'induire la fibrillation de la forme trois « repeat » de tau (sans le domaine R2, ne possédant qu'un résidu cystéine). En présence d'un réducteur ou si cet acide aminé est muté, la fibrillation de la protéine tau contenant trois « repeat » est ralentie. De plus, d'après les études RMN menées par Mandelkow et col.^{56,70}, la formation du pont disulfure *via* les cystéines 322 de la protéine tau permettrait d'orienter l'élongation de la fibre. Les auteurs ont proposé deux possibilités pour la formation des ponts disulfures : une orientation des brins β en parallèles ou en antiparallèle (Fig. 115 paragraphe III.1.1.2). Dans nos travaux, le peptide **linR3** forme des ponts disulfures intermoléculaires et l'orientation des brins n'est pas imposée. En revanche, la présentation des peptides sur la DCP oriente les brins en parallèle et des ponts disulfures en intramoléculaires peuvent être formés. D'après nos résultats, le DTT a une influence en particulier pour la **D6C-2R3**. Nous pouvons donc supposer que l'empêchement de la formation de ponts disulfures intramoléculaires pour ce composé ralentit la formation de structures en feuillets β , ce qui tend vers une orientation des brins β en parallèles dans ces feuillets.

L'addition d'héparine à la **D6C-2R3** donne des résultats similaires à ceux obtenus pour le peptide **linR3**. L'étude par dichroïsme circulaire (Fig. 127) montre une structure en feuillets β en présence d'héparine (condition 3) et une structure partiellement désordonnée et en feuillets β sans héparine (condition 2). Les signaux obtenus pour la **D6C-2R3** sont plus faibles que ceux obtenus avec le peptide **linR3** car les échantillons sont moins concentrés (50 μ M et 100 μ M respectivement). De nouveau, l'héparine semble accélérer la formation des structures en feuillets β .

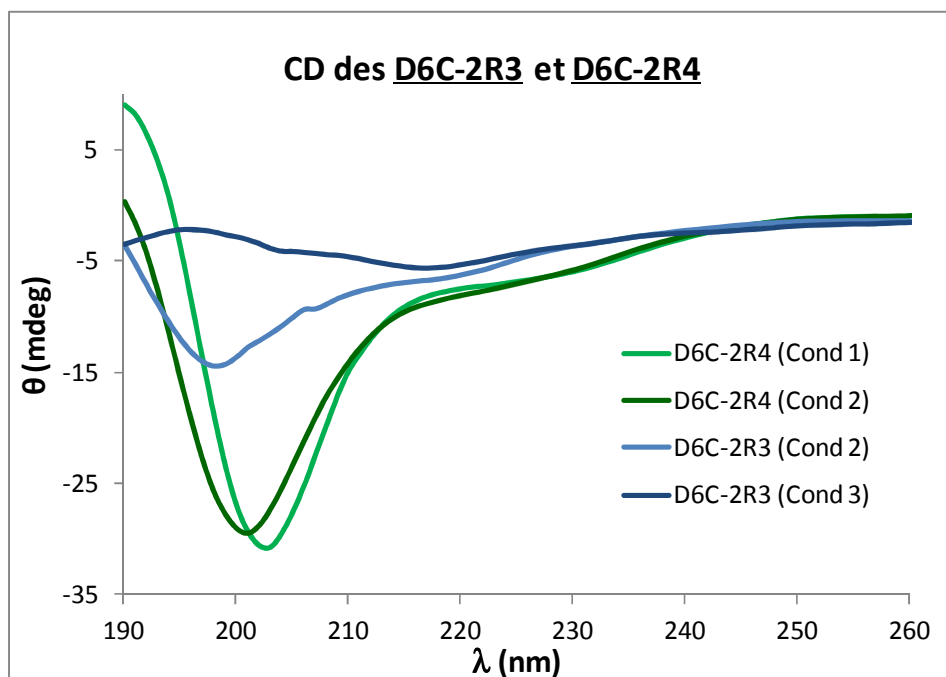


Fig. 127. Dichroïsme circulaire des composés D6C-2R3 et D6C-2R4

Dans toutes les conditions aucun signal en fluorescence n'est observé pour la D6C-2R4 ($C=50\ \mu\text{M}$). La D6C-2R4 n'est pas structurée en dichroïsme circulaire ce qui est cohérent avec l'absence de signal en fluorescence.

Lorsque les D6C-2R4 et D6C-2R3 sont incubées ensemble ($C=25\ \mu\text{M}$ pour chaque DCP) dans les différentes conditions, les mêmes observations que celles émises pour la D6C-2R3 peuvent être énoncées. De nouveau, il est difficile de conclure sur l'interaction des composés avec les données obtenues.

Un autre aspect étudié dans ce travail est la présentation des peptides sur le châssis moléculaire dicétopiperazine qui permet de contraindre les peptides dans l'espace. Les résultats obtenus pour le peptide linR3 et la D6C-2R3 en absence (condition 2) et en présence (condition 4) d'héparine sont réunis dans la figure ci-dessous (Fig. 128).

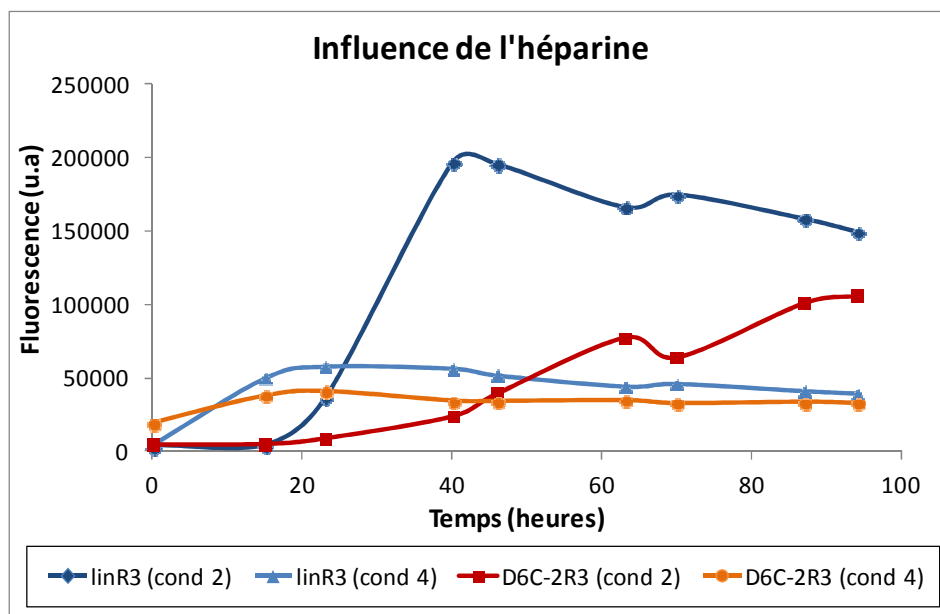


Fig. 128. Suivi par émission de fluorescence de la ThT des structures formées par linR3 et D6C-2R3 en absence (cond 2) ou en présence (cond 4) d'héparine

La D6C-2R3 est deux fois moins concentrée (50 μM) que le peptide linR3 (100 μM) car elle présente deux équivalents de peptide. Nous nous attendons donc à observer un signal de fluorescence au moins identique pour les deux composés. C'est le cas en présence d'héparine (mais pas en son absence). Or nous avons vu qu'une structuration complète en feuillets β avait lieu en présence de cet inducteur. Ceci laisse supposer que la présentation du peptide sur la DCP permet de les orienter dans l'espace et d'accélérer la formation de structures en feuillets β . Cependant, la fluorescence émise par la ThT ne reflète pas systématiquement la formation de fibres amyloïdes. La morphologie des structures formées doit être vérifiée par microscopie.

III.3.3. Second test de fibrillation et d'inhibition

La possibilité de former des structures contenant des feuillets β avec les composés linR3 et D6C-2R3 ont ensuite été testés. Pour cela, ces composés ont été incubés dans le tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4), en présence d'héparine et de DTT, qui sont couramment utilisés pour la fibrillation *in vitro* de la protéine htau40, à 37 °C. De plus, dans des conditions proches, nous avons observé l'apparition de structures en feuillets β avec ces composés. La formation de ces structures est suivie par émission de fluorescence de la thioflavine S (ThS), qui est le colorant le plus utilisé pour suivre la formation des fibres de tau. En effet, Friedhoff et al.⁴⁸ ont comparé le déplacement de l'émission de fluorescence de la ThT et de la ThS en présence de fibres de tau. Le signal obtenu avec la ThS est deux fois plus important que celui obtenu avec la ThT lorsque les fibres sont formées en présence d'héparine. Lorsqu'un autre inducteur, le

polyglutamate, est utilisé le signal observé avec la ThT est cinq fois inférieur au signal observé en utilisant l'héparine (pas de différence avec la ThS). Les résultats pour **linR3** et **D6C-2R3** avec la ThS et la ThT sont réunis dans la figure présentée ci-dessous (Fig. 129).

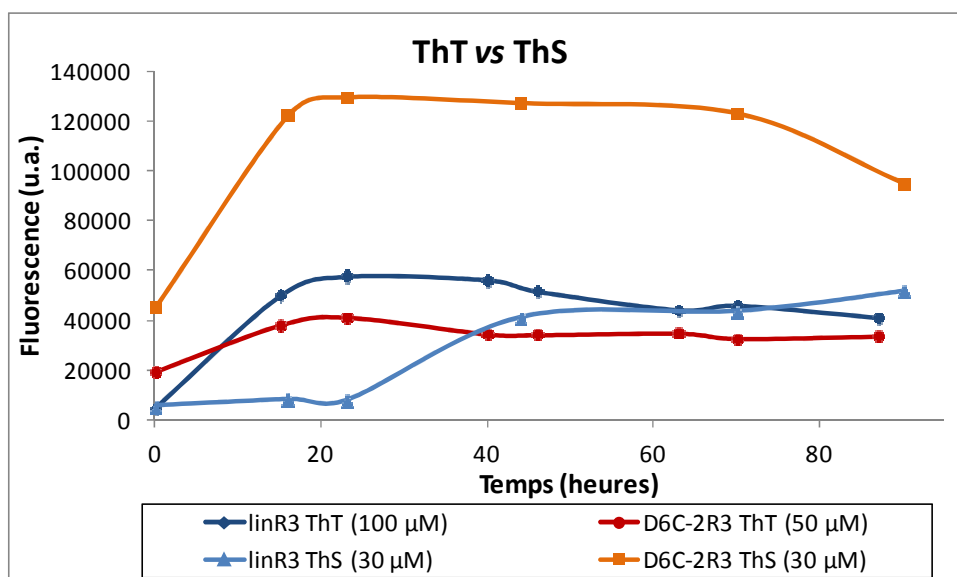


Fig. 129. Suivi de la fluorescence de **linR3** et **D6C-2R3** avec la ThT ou la ThS (en présence d'héparine)

L'intensité du signal de fluorescence obtenue avec la ThS pour le peptide **linR3** à 30 μM équivaut à celle obtenue avec la ThT pour une concentration en **linR3** de 100 μM. Pour la **D6C-2R3** l'intensité du signal de fluorescence est beaucoup plus élevée avec la ThS par rapport à celle mesurée avec la ThT et pour un écart de concentration moins important ([**D6C-2R3**]=50 μM avec la ThT et ≈30 μM avec la ThS). De plus, avec la ThS, le signal est environ trois fois plus intense avec la **D6C-2R3** (30 μM) que celui obtenu avec le peptide **linR3** à la même concentration. Ainsi, deux informations sont apportées par ces résultats. D'une part, la ThS permet d'obtenir un signal plus intense pour suivre la formation de structures en feuillets β avec nos mimes. D'autre part, la présentation des peptides sur le châssis DCP permettrait de former plus efficacement ces structures. La fibrillation du peptide **linR3** et de la **D6C-2R3** a également été réalisée dans le PBS, en présence d'héparine à deux ratios différents (4:1 et 8:1 composé/Hep, respectivement). La formation de feuillets β est suivie par émission de fluorescence de la ThS (10 μM). Pour chaque composé l'intensité de fluorescence est quasiment identique pour les deux ratios d'héparine testés.

Nous avons également cherché à étudier la possibilité d'effectuer des tests d'inhibition de la fibrillation de nos mimes *in vitro*^{128,130b}. Cela permettrait de réaliser des tests d'inhibition de la fibrillation : (i) plus reproductibles que ceux effectués avec les isoformes ou les mutants de tau, (ii) permettant de cibler les structures en feuillets β

formées dans le motif R3 de la protéine. Dans la littérature, il a été décrit que des fragments peptidiques (moins de dix acides aminés) de peptides ou protéines amyloïdes peuvent former des fibres *in vitro*^{69,183,261,262}, dont l'héxapeptide Ac-VQIVYK-NH₂ (tau₃₀₆₋₃₁₁)^{262,263}. Ce dernier a été utilisé pour des tests d'inhibition de la fibrillation *in vitro*¹⁸³. Notre modèle permet d'étudier un fragment plus étendu de la protéine, qui d'après les études RMN^{259,260} contient plusieurs feuillets β et qui peut être facilement synthétisé chimiquement au laboratoire.

Ainsi, l'évolution de la fluorescence de la ThS au cours du temps pour le peptide **linR3** et la **D6C-2R3** (avec héparine) a été étudiée en présence d'un inhibiteur de la fibrillation de la protéine tau décrit dans la littérature (bleu de méthylène, IC₅₀=1,9 μ M, Tanaguchi et al¹⁸⁹) et d'une de nos molécules potentiellement inhibitrice (D3C-His/VQIVYK **90**). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tabl. 19-).

Tabl. 19- Résultats obtenus pour le second test de suivi par fluorescence (ThS)

Composé	Conditions	linR3 (% de fluorescence)	D6C-2R3 (% de fluorescence)
Aucun	C=30 μ M	100%	100%
Bleu de Méthylène	C=30 μ M	2%	2%
	C=3 μ M	58%	56%
D3C-His/VQIVYK 90	C=30 μ M	119%	113%
	C=3 μ M	85%	109%

Le bleu de méthylène est introduit avec le peptide **linR3** (30 μ M) et la **D6C-2R3** (30 μ M) à deux concentrations différentes (30 et 3 μ M) (Fig. 130 et Fig. 131). Les deux mimes sont également mis en présence de la D3C-His/VQIVYK **90** aux deux mêmes concentrations. Le test est réalisé dans le PBS, en présence d'héparine (4:1 composé/Hep) et de DTT à 37 °C. L'évolution de l'émission de la fluorescence de la ThS est mesurée au cours du temps.

261.(a) Liang, Y.; Lynn, D. G.; Berland, K. M., Direct observation of nucleation and growth in amyloid self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (18), 6306-6308; (b) Mehta, A. K.; Lu, K.; Childers, W. S.; Liang, Y.; Dublin, S. N.; Dong, J.; Snyder, J. P.; Pingali, S. V.; Thiyagarajan, P.; Lynn, D. G., Facial symmetry in protein self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9829-9835.

262.(a) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D., Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **2005**, *435* (7043), 773-778; (b) Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J.; McFarlane, H. T., Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* **2007**, *447* (7143), 453-457.

263.Goux, W. J.; Kopplin, L.; Nguyen, A. D.; Leak, K.; Rutkofsky, M.; Shanmuganandam, V. D.; Sharma, D.; Inouye, H.; Kirschner, D. A., The Formation of Straight and Twisted Filaments from Short Tau Peptides. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (26), 26868-26875.

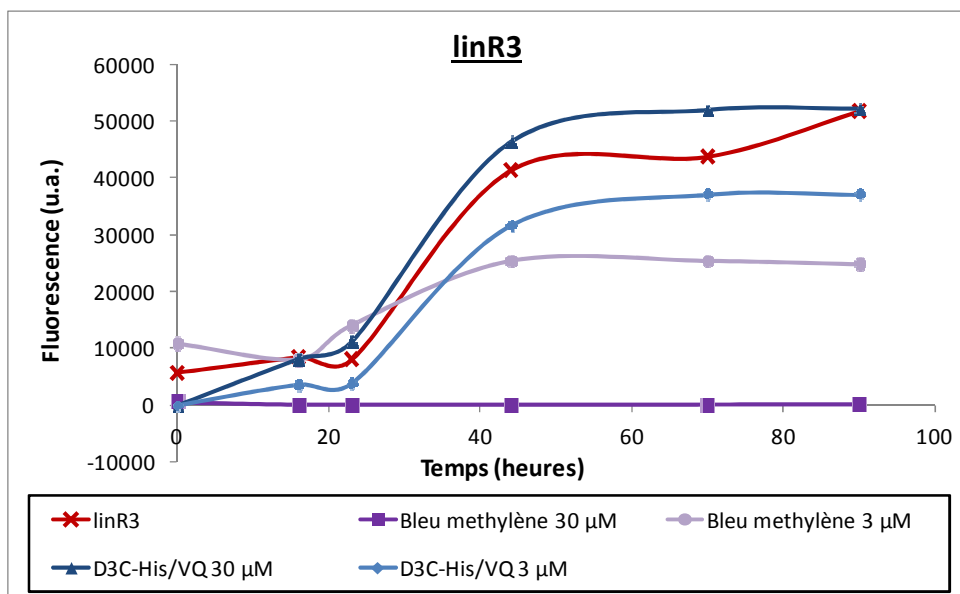


Fig. 130. Test de fibrillation et d'inhibition suivi par fluorescence (ThS) avec linR3

Aucun signal de fluorescence n'est observé par rapport aux composés linR3 et D6C-2R3 seuls pour un ajout de bleu de méthylène à une concentration de 30 µM (Fig. 130 et Fig. 131). Le signal de fluorescence est diminué environ de moitié par rapport aux composés seuls pour une concentration de 3 µM en bleu de méthylène. Ceci pourrait valider l'utilisation du peptide linR3 et de la D6C-2R3 pour tester le potentiel inhibiteur de molécules agissant sur la formation du cœur hydrophobe de la protéine tau.

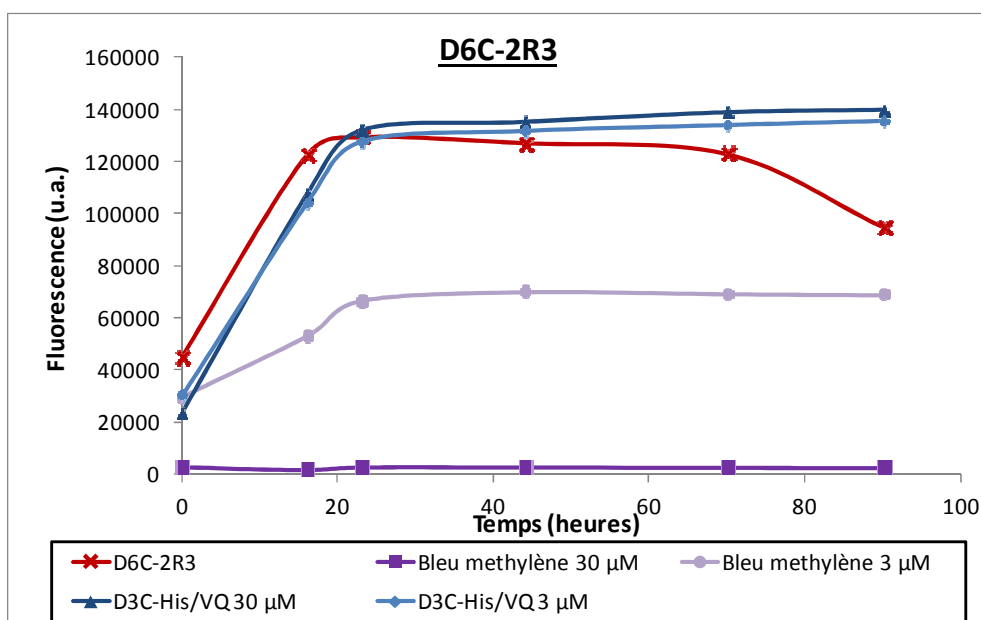


Fig. 131. Test de fibrillation et d'inhibition suivi par fluorescence (ThS) avec D6C-2R3

L'introduction de notre composé 90 (aux deux concentrations) avec le peptide linR3 et la D6C-2R3 résulte globalement en une augmentation du signal de fluorescence.

La morphologie des structures formées doit être vérifiée par microscopie afin de déterminer si les fibres formées sont similaires à celles de la protéine tau (**90** induirait la fibrillation) ou ont une morphologie différente. En effet, Necula et al²⁰⁵ ont montré que certains composés inhibent la toxicité de fibres amyloïdes en favorisant la formation de fibres non toxiques.

Les résultats obtenus avec ce second test de fluorescence indiquent que :

- La présentation des peptides sur le châssis DCP pourrait favoriser la formation de structures en feuillets β
- La formation des structures en feuillets β pourraient être inhibées par des petites molécules
- Le composé D3C-His/VQIVYK **90** pourrait interagir avec les structures formées.

III.3.4. Etude par microscopie à force atomique (AFM)

Afin de déterminer la structure adoptée par le peptide **linR3** et la **D6C-2R3** dans les conditions de fibrillation, des études par AFM ont été effectuées.

Dans un premier temps nous avons observé les fibres de l'isoforme htau40 de la protéine tau qui serviront de référence afin de comparer les structures formées par nos composés. Nous avons produit la protéine tau par transformation des bactéries *Escherichia coli* avec des plasmides possédant le gène de l'isoforme htau40 de la protéine tau (plasmides fournis par l'équipe du Pr. Ghezzi). Les bactéries transformées sont mises en culture puis la transcription du gène est induite et les bactéries sont éclatées. La protéine tau est obtenue après purification par colonne échangeuse d'ions puis gel filtration d'après les protocoles établis dans la littérature^{264,265}. La protéine tau purifiée est alors incubée dans le tampon PBS (pH 7,4), en présence d'héparine (4:1 protéine/héparine) et de DTT à 37 °C pendant 7 jours. La ThT est ajoutée à un aliquot de la solution. Une augmentation de la fluorescence est observée par rapport au temps zéro. La morphologie des structures formées est observée par AFM (Fig. 132). Des fibres similaires à celles décrites dans la littérature sont obtenues : elles sont enroulées avec une périodicité de l'enroulement d'environ 60 nm (Fig. 132). La longueur des fibres est supérieure à 200 nm, ce qui est de nouveau conforme à ce qui est énoncé dans la littérature.

264. Barghorn, S.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments in vitro. *Methods Mol. Biol* **2005**, 299, 35-51.

265. Csokova, N.; Skrabana, R.; Liebig, H.-D.; Mederlyova, A.; Kontsek, P.; Novak, M., Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Expression Purif.* **2004**, 35 (2), 366-372.

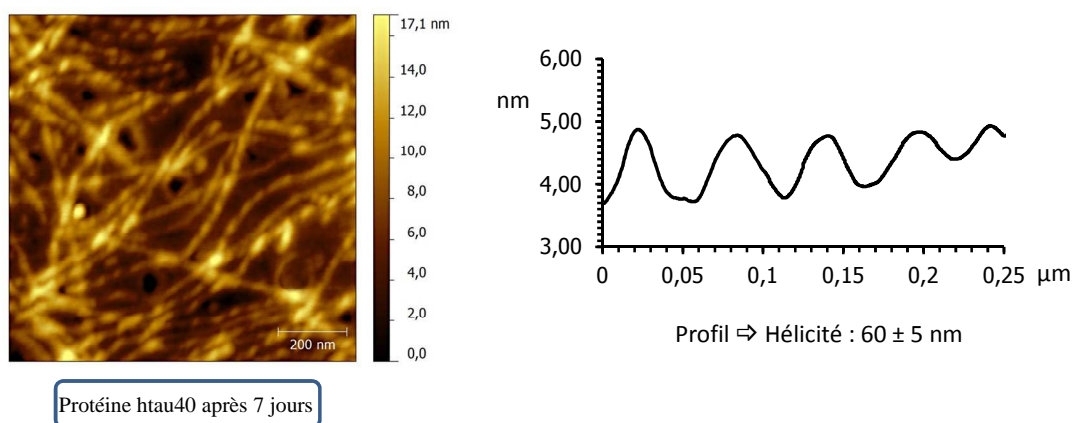


Fig. 132. Fibres de l'isoforme htau40 observées en AFM après 7 jours d'incubation dans le tampon PBS (pH 7,4), en présence d'héparine et de DTT à 37 °C

Dans un second temps, le peptide linR3 et la D6C-2R3 sont incubés dans les mêmes conditions que la protéine tau²⁶⁴ et les structures formées sont étudiées par mesure de la fluorescence de la ThT, par dichroïsme circulaire et AFM.

La mesure de la fluorescence de la ThT au cours du temps de l'incubation du peptide linR3 dans le tampon PBS (pH 7,4 sans DTT), en présence d'héparine (4:1 protéine/héparine) à 37 °C, correspond à une courbe sigmoïdale à deux plateaux (premier plateau à 7 jours et second plateau à 14 jours). Dès le premier plateau, une structuration en feuillets β est observée par dichroïsme circulaire. Des fibres sont observées par AFM mais leurs morphologies sont différentes à chaque plateau (Fig. 133).

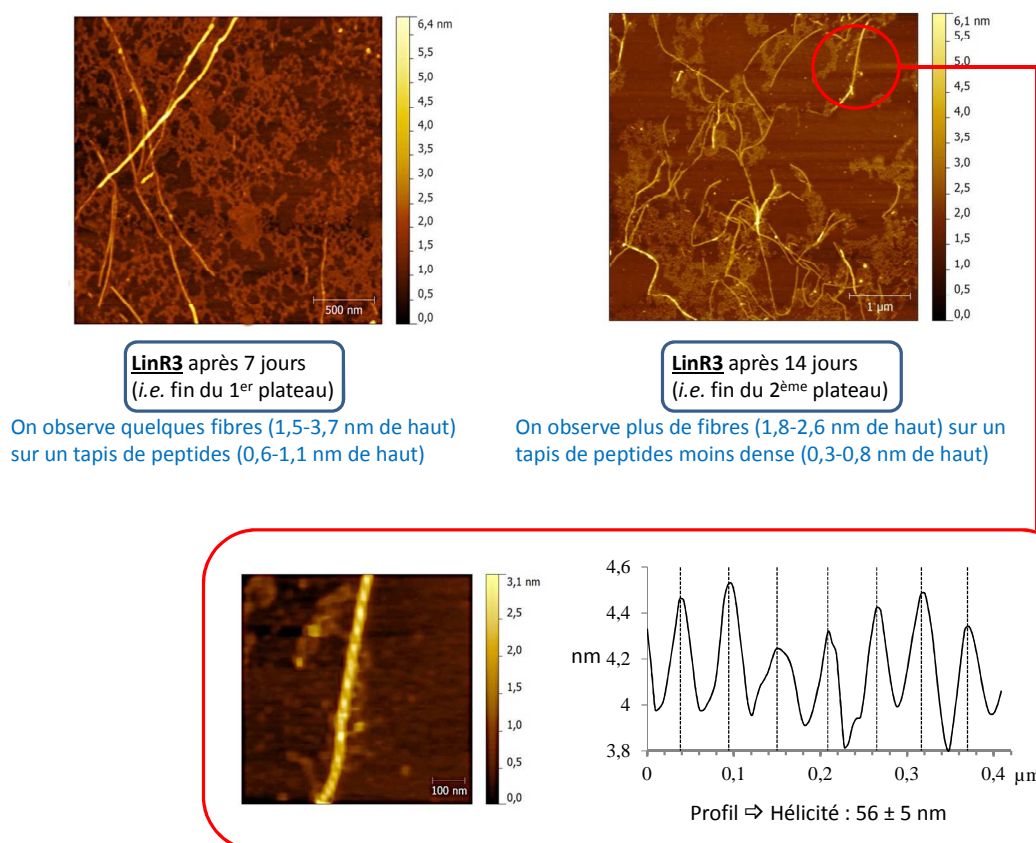


Fig. 133. Fibres formées par le peptide linR3 observées en AFM après 7 et 14 jours d'incubation dans le tampon PBS (pH 7,4), en présence d'héparine à 37 °C

Après 7 jours d'incubation du peptide linR3 (premier plateau observé par fluorescence de la ThT) quelques fibres peu épaisses (environ 1,5 nm) et certaines plus épaisses (environ 3,7 nm) déposées sur un tapis de peptides semblable à de la « mousse » sont obtenues (Fig. 133). Après 14 jours d'incubation (second plateau en fluorescence) le tapis peptidique est moins dense et un plus grand nombre de fibres est observé (Fig. 133). Celles-ci sont plus épaisses qu'auparavant (entre 1,8 et 2,6 nm). L'agrandissement d'un facteur dix d'une fibre permet de voir et de mesurer le pas d'hélice des fibres qui est de 56 nm ce qui correspond à ce qui est obtenu pour les fibres de tau. De nouveau, la longueur des fibres est supérieure à 200 nm.

Nous avons également cherché à déterminer la morphologie des fibres en présence de DTT. Les premiers résultats semblent indiquer un nombre de fibres moins important et la présence d'agrégats plutôt sphériques. Ces derniers pourraient être des formes oligomériques éventuellement pré-fibrillaires. Les fibres observées correspondent à deux protofilaments s'enroulant l'un autour de l'autre (comme les PHF) avec un pas d'hélice irrégulier. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'établir la morphologie exacte des structures et de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

De la même manière, la **D6C-2R3** est incubée dans le tampon PBS (pH 7,4, sans DTT), en présence d'héparine (4:1 protéine/héparine) à 37 °C pendant 7 jours. Comme précédemment, une augmentation de la fluorescence de la ThT est observée immédiatement après l'addition de l'héparine et l'intensité de fluorescence est stable au cours du temps. Les mesures en dichroïsme circulaire indiquent une structuration complète en feuillets β . Les structures observées par AFM possèdent une morphologie différente de celles obtenues auparavant pour la protéine htau40 et le peptide **linR3** (Fig. 134).

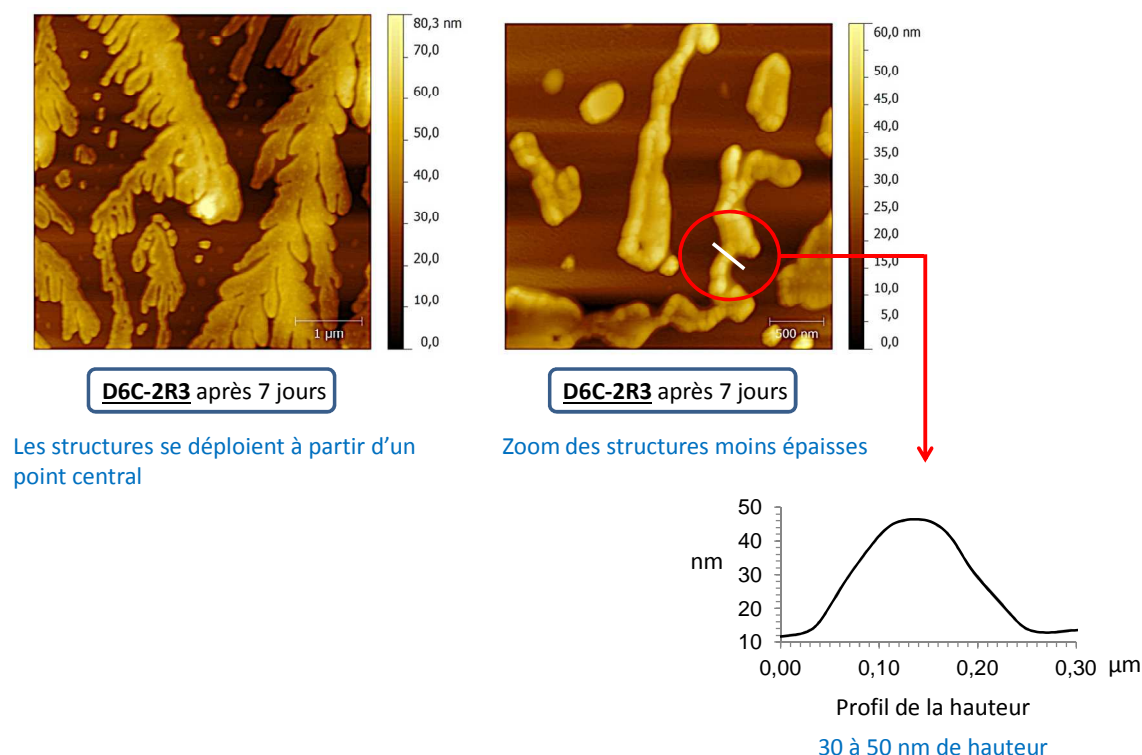


Fig. 134. Structures formées par la **D6C-2R3** observées en AFM après 7 jours d'incubation dans le tampon PBS, en présence d'héparine à 37 °C

Les structures observées après incubation de la **D6C-2R3**, sont plus épaisses que celles obtenues pour le peptide **linR3**, avec une hauteur entre 30 et 50 nm. Les structures semblent s'empiler les unes sur les autres (hauteur 50 nm). Leur morphologie est similaire à celle d'une feuille avec un point central à partir duquel les fibres s'étendent (Fig. 134). Les structures sont trop épaisses pour observer la morphologie des sous-structures (protofilaments) et mesurer un éventuel pas d'hélice. L'ajout de DTT ne change pas la morphologie des structures obtenues. En absence d'héparine, un tapis peptidique semblable à de la mousse (similaire à celui observé pour **linR3**) est obtenu.

III.3.5. Synthèse des résultats et conclusion

Afin d'étudier la structure et le mécanisme de fibrillation de la protéine tau, nous avons développé un mimé synthétique. Pour cela, des séquences des motifs de répétition R3 et R4 impliquées dans le processus de fibrillation ont été sélectionnées. Les peptides linR3 et linR4 ont ainsi été synthétisés. Afin de pré-organiser ces séquences dans l'espace et augmenter la concentration locale en peptide, ces séquences ont été liées sur le châssis D6C : D6C-2R3 et D6C-2R4.

La mesure de l'évolution de la fluorescence de la ThT et de la ThS au cours du temps et les mesures en dichroïsme circulaire suite à l'incubation de nos composés dans différentes conditions nous ont permis d'observer :

- Pour le peptide linR4 et la D6C-2R4 : aucune formation de structures en feuillets β dans toutes les conditions testées.
- Pour le peptide linR3 et la D6C-2R3 : la formation de structures en feuillets β en présence d'héparine et une structuration partielle en absence d'héparine

Ces études n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre les peptides linR3/linR4 et les D6C-2R3/D6C-2R4.

Le second test de suivi de fluorescence avec la ThS a montré que la formation de feuillets β par les composés linR3 et D6C-2R3 peut être inhibée par le bleu de méthylène. Ce résultat est à confirmer en AFM et avec d'autres composés inhibiteurs décrits dans la littérature. Ce test pourrait ainsi permettre d'évaluer le pouvoir inhibiteur de nos composés sur la fibrillation de la protéine tau et de cibler des composés actifs sur la formation de feuillets β par le motif R3 de la protéine tau.

La formation de fibres par le peptide linR3, en présence d'héparine, semblables à celles obtenues avec la protéine tau entière a été observée par AFM. En absence d'héparine, aucune fibre n'a pu être observée en AFM bien qu'une structuration partielle en feuillets β soit observée en dichroïsme circulaire. De plus, dans les premiers tests de suivi de fluorescence effectués un seul plateau est observé tandis que pour les échantillons réalisés pour l'étude par AFM deux plateaux sont observés. Le temps d'incubation pour cette dernière étude était plus long. Les premiers tests devront donc être réitérés avec un temps d'incubation plus long et les structures formées devront être observées par AFM. Un temps d'incubation plus étendu permettra peut-être la formation de fibres en absence d'héparine.

La morphologie des structures obtenues avec la **D6C-2R3** (en présence d'héparine) est différente : des structures plus épaisses en forme de feuilles sont obtenues. La cinétique de formation de ces structures est plus rapide. Comme précédemment, en absence d'héparine, ces structures ne sont pas observées et une structuration partielle en feuillets β est déterminée en dichroïsme circulaire. De nouveau un temps d'incubation plus long pourrait permettre la formation de fibres en absence d'héparine. La modulation du ratio héparine/**D6C-2R3** doit également être étudiée afin de tester son influence sur la cinétique de formation des structures. L'utilisation de concentrations plus faibles en **D6C-2R3** pourrait également permettre d'obtenir des structures plus fines.

Les résultats obtenus sont encourageants et tendent à montrer que les composés **linR3** et **D6C-2R3** constituent des modèles de la fibrillation du motif R3 de la protéine tau. La structuration en feuillets β de ces composés en présence d'héparine a pu être établie par des mesures en fluorescence avec des fluorophores spécifiques de ces structures (ThT et ThS) ainsi qu'en dichroïsme circulaire. La microscopie par force atomique a montré pour le peptide **linR3** la formation de fibres semblables à celles formées par la protéine tau entière. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature pour cette séquence de la protéine tau^{56,68,69,70,259,260}. En revanche, les structures formées par la **D6C-2R3** sont moins résolues et des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si une cinétique plus lente permettrait d'obtenir des structures plus proches de celles des fibres. Cependant, les résultats tendent à montrer que la pré-organisation sur le châssis D6C permet d'accélérer la formation de feuillets β . L'ajout de DTT en présence d'héparine donne lieu à une diminution de la cinétique d'après les mesures en fluorescence. L'introduction de deux peptides en antiparallèle sur la DCP pourrait donc être plus favorable à la formation de structures en feuillets β .

IV. Conclusion

Dans la première partie de ce projet de recherche, nous avons conçu, synthétisé et évalué des assemblages présentant des motifs peptidiques ou hétéroaromatiques capables de cibler les fibres du peptide A β et/ou de la protéine tau. La présentation multimérique de ces motifs a été assurée par l'utilisation d'un châssis dicétopiperazine (ou DCP) présentant plusieurs fonctions amines comme site de fixation. Ce châssis permet d'introduire un à trois motifs d'intérêt et de les orienter dans l'espace pour obtenir des composés plus affins. La DCP a également été choisie pour son potentiel comme transporteur (ou « navette ») pour le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Nous avons donc du mettre au point la synthèse de plusieurs châssis DCP dont les fonctions amines sont orthogonalement protégées. Les châssis D6C-Boc/2Alloc **11** et Alloc/2Boc **22** en particulier ont été synthétisés avec de bons rendements (54 et 70% respectivement pour 5 étapes) et à grande échelle (de l'ordre du gramme). La synthèse d'autres châssis (variation de la nature des groupes protecteurs ou de la longueur des chaînes aminoalkyles) n'a pas été facile. Pour certains châssis les synthèses doivent encore être optimisées. L'assemblage de un à trois composés peptidiques ou hétéroaromatiques a été effectué à partir de châssis D6C et D3C. Des assemblages présentant une histidine pour le radiomarquage au ^{99m}Tc ont également été synthétisés. L'étape de radiomarquage a pu être réalisée, en collaboration avec l'équipe du Pr. Ghezzi, pour la plupart de ces composés bien que pour certains elle reste à optimiser.

Ces assemblages marqués au ^{99m}Tc ont permis d'évaluer la capacité de notre châssis à passer la BHE *in vivo* chez la souris. Les premiers tests réalisés ont montré que les châssis D6C **79** et D3C **80** sans motif de reconnaissance pénètrent dans le cerveau. L'assemblage D3C-His/VQIVYK **90** pénètre également dans le cerveau, avec un pourcentage comparable à ceux obtenus avec les châssis seuls. Ces résultats valident le potentiel de ce châssis en tant que transporteur pour la pénétration cérébrale de composés thérapeutiques ou d'outils diagnostiques de la maladie d'Alzheimer. Des tests complémentaires avec nos autres assemblages ainsi que des tests *ex vivo* de liaison de nos composés sur des coupes de cerveaux devraient permettre d'évaluer leur affinité pour le peptide A β et/ou la protéine tau. Les assemblages présentant deux motifs de reconnaissance pourront être comparés à leurs homologues n'en possédant qu'un.

L'effet de la présentation multimérique a été évalué avec des tests d'inhibition *in vitro* de la fibrillation du peptide A β_{40} en présence de nos assemblages D6C présentant un à trois motifs de reconnaissance peptidiques ou hétéroaromatiques. La présentation de deux motifs peptidiques KLVFFA sur le châssis D6C permet d'obtenir une meilleure inhibition que celle observée pour le peptide non lié sur la DCP. La D6C-NH₂/2KLVFFA **49**

possède la meilleure activité. Cet effet n'est pas observé avec les assemblages D6C présentant deux motifs hétéroaromatiques. L'activité obtenue est comparable à celle observée avec les assemblages comportant un motif ou avec les composés de référence non liés sur le châssis. Les activités inhibitrices obtenues pour les différents motifs aromatiques sont comparables. Nos résultats tendent à montrer que ces composés hétéroaromatiques ne reconnaissent pas spécifiquement le peptide A β tandis que les peptides pourraient être spécifiques d'un ou l'autre de nos cibles (les assemblages VQIVYK n'inhibent pas la fibrillation du peptide A β). Cette sélectivité peut être intéressante pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer afin de cibler spécifiquement les dépôts amyloïdes ou les DNF. Cependant en thérapie, le ciblage des deux lésions peut aussi présenter un intérêt ce qui pourrait être effectué avec les molécules aromatiques.

Les tests d'inhibition de la fibrillation du peptide A β doivent être affinés et confirmés par des études de microscopie. Des tests complémentaires d'inhibition de la toxicité des fibres du peptide A β et de la protéine tau par nos assemblages pourraient être envisagés en collaboration avec une autre équipe de recherche. D'autres motifs de reconnaissance pourraient être couplés sur le châssis D6C afin de moduler le pouvoir inhibiteur de la fibrillation, l'affinité de liaison pour les cibles ou la spécificité pour une cible. De plus, nos composés seront évalués prochainement par des tests d'inhibition *in vitro* de la fibrillation de la protéine tau. Ces tests n'ont malheureusement pas pu être effectués pour l'instant car bien que documentés dans la littérature, la surexpression et la purification de cette protéine de 441 acides aminés ont demandé beaucoup de temps. Bien que récemment la protéine tau ait été obtenue, la faible quantité produite reste un facteur limitant. C'est pourquoi, nous avons envisagé dans un second temps de développer des mimes synthétiques de la protéine tau. L'objectif était d'obtenir des outils de sélection plus facilement accessibles et manipulables que la protéine tau pour un premier criblage des molécules. De plus, ces mimes avaient également un intérêt plus fondamental pour étudier le processus de fibrillation.

Pour synthétiser ces mimes, deux fragments peptidiques d'une vingtaine d'acides aminés, des motifs de répétition R2 et R3, impliqués dans la fibrillation de la protéine, ont été sélectionnés. Deux exemplaires de ces peptides ont été greffés sur le châssis D6C afin de les pré-organiser dans l'espace supposant qu'ainsi ces assemblages pourraient former des structures fibrillaires plus rapidement que les peptides sous forme monomères. Ces travaux ont montré que le fragment peptidique issu du motif R3, seul (**linR3**) ou organisé sur un châssis (**D6C-2R3**), se structure totalement en feuillets β quand il est incubé dans du tampon phosphate (pH 7,4) en présence d'héparine. L'étude par microscopie à force atomique (AFM) a montré que le peptide **linR3** forme des fibres présentant les caractéristiques de celles formées par la protéine tau native. Ces fibres ont une

morphologie torsadée avec un pas d'hélice d'environ 60 nm. La **D6C-2R3** forme des structures épaisses en forme de « feuilles » en AFM. L'ajout d'héparine à ce composé résulte en une augmentation immédiate de la fluorescence. Nous supposons donc que la formation de structures en feuillets β est rapide ce qui résulte en une agrégation du composé. La présence d'une structure fibrillaire est difficile à observer. L'utilisation de ce composé à plus faible concentration ou l'utilisation d'un ratio héparine/**D6C-2R3** plus faible pourrait permettre de ralentir la cinétique d'agrégation afin d'obtenir des structures plus fines et de nature fibrillaires. L'influence du sens de liaison des motifs peptidiques sur le châssis pourrait être étudiée soit en les couplant par leur extrémité C-terminale, soit en couplant un motif par son extrémité C-terminale et l'autre par son extrémité N-terminale. Enfin, une inhibition de la formation de structures en feuillets β par le peptide **linR3** et la **D6C-2R3** a été mise en évidence en présence du bleu de méthylène, inhibiteur connu de la fibrillation de tau (test de fluorescence de la ThS). D'autres inhibiteurs connus de la fibrillation de la protéine tau décrits dans la littérature devront être testés et les résultats vérifiés par AFM afin de valider ce test comme un test d'inhibition de la fibrillation de la protéine tau *in vitro*. Malheureusement, ces tests n'ont pas pu être réalisés au cours de ce projet. En effet, le temps consacré à cette partie a été court. Cependant, ce mime de première génération est prometteur comme outil pour des tests d'inhibition *in vitro* et pour l'étude structurale de la fibrillation de la protéine tau.

V. Partie Expérimentale

La partie expérimentale du manuscrit est rédigée en anglais. Ce document pourra alors être employé par tous les utilisateurs du laboratoire, y compris les collaborateurs étrangers, et constitue par ailleurs un outil profitable pour la rédaction des publications relatant nos travaux.

V.1. Protocoles de synthèse

V.1.1. Materials and instruments

V.1.1.1. Reagents

Protected amino acids were obtained from Activotec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®], HATU[®] and TFFH[®] were purchased from Calbiochem-Novabiochem and PyAOP[®] from PerSeptive Biosystems (Foster City, Canada). Rink-amide MBHA was obtained from Calbiochem-Novabiochem and 2-chlorotritylchloride[®] resin from Advanced ChemTech Europe. Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Acros (Noisy-le-Grand, France).

V.1.1.2. Instruments

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was the Nucleosil 120 Å 3 µm C₁₈ particles, 30 × 4 mm² operated at 1 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time (classical program 5 to 100% B in 15 min).

RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL.min⁻¹ nitrogen. The preparative column Delta-Pak™, 300 Å 15 µm C₁₈ particles, 200 × 25 mm², was operated at 22 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. Solvents A and B were the same than the ones used in RP-HPLC analysis. The preparative column Discovery[®] BIO Wide Pore, 300 Å 10 µm C₅ particles, 25 cm x 10 mm, was operated at 5 mL min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time.

For both RP-HPLC, UV monitoring was performed at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisted of H₂O containing 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were of HPLC use quality.

Electrospray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker). The multiply charged data produced by the mass spectrometer on the m/z scale were converted to the molecular weight.

NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 400 and U⁺ Varian spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal

reference²⁶⁶. Coupling constants are in Hz and signals are described using the usual abbreviations: br (broad), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet)...

V.1.2. Synthesis protocols

Protocol A: Nosyl addition

To a solution of H₂N-Lys(X)-OMe (1 eq.) and Et₃N (3 eq.) in water/dioxane (0.1 M, 1:1) cooled in an ice bath, a solution of *o*-nitrobenzoyl chloride (1.4 eq.) in dioxane (4 M) was added dropwise. The mixture was stirred for 30 min at 0 °C then overnight at room temperature. Water was added and the pH was adjusted at 2 with HCl 1M. The mixture was extracted three times with ethylacetate and the combined organic phases were washed twice with saturated NaHCO₃, once with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under *vacuum* and lyophilized to give Ns-Lys(X)-OMe.

Protocol B: Mitsunobu

To a solution of Ns-Lys(X)-OMe (1 eq.) in anhydrous THF (0.1 M), PPh₃ (1.6 eq.), aliphatic alcohol (1.6 eq.) and DIAD (1.6 eq.) were respectively added. The reaction was stirred for at room temperature under argon and monitored by TLC. After the completion of reaction the solvent was removed in *vacuum*. The residue was purified by column chromatography to obtain a mixture of product and aliphatic alcohol which was used without further purification.

Protocol C: Nosyl cleavage

The mixture containing the Mitsunobu reaction product was dissolved in anhydrous DMF (0.1 M) and K₂CO₃ (6 eq.) was added. The solution was degassed with argon during 10 min and PhSH (3 eq.) was introduced dropwise. After 3 h of stirring under argon, water was added and the aqueous mixture was extracted three times with diethyl ether. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was purified by column chromatography to provide the secondary amine.

Protocol D: Coupling of Fmoc-Amino Acid(Y)-OH to secondary amine

To a mixture of Fmoc-Amino Acid(Y)-OH (2.5 eq.) and HATU (2.5 eq.) in anhydrous DCM (0.2 M) was added DIEA (4 eq.) was added. The solution was stirred for 30 min under argon, and then the secondary amine (1 eq. dissolved at 0.2 M in anhydrous DCM) was added. The solution was stirred under argon and the completion of the reaction was monitored by TLC. The mixture was diluted with DCM and the organic phase was washed with saturated NaHCO₃, 5% aqueous NaHCO₃, water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography to give the dipeptide.

Protocol E: Diketopiperazine formation

Dipeptide (1 eq.) was dissolved in a piperidine/DCM (0.2 M, 2:8) solution. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After addition of DCM, the organic layer was washed twice with 10% citric acid solution, once with water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the diketopiperazine.

266. Fulmer, G. R.; Miller, A. J.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I., NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* **2010**, 29 (9), 2176-2179.

Protocol F: Alloc cleavage

To a solution of diketopiperazine in anhydrous DCM (0.02 M) under argon, PhSiH_3 (10 eq. by site) and $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (0.02 eq.) were added. The mixture was stirred for 2 h under inert atmosphere, and then MeOH (1 mL) was introduced. The solvent was removed under *vacuum*.

Protocol G: Oxime linkage

To a solution of diketopiperazine oxyamine (1 eq.) was dissolved in a TFA/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.005 M, 5:2:3) solution. The peptide aldehyde (1.2 eq. by oxyamine moiety) was added and the mixture was heated at 37 °C. The progress of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm). The product was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm) and lyophilization.

Protocol H: CuAAC

Diketopiperazine azide (1 eq.) and alkyne (1.2 eq. by azide moiety) were dissolved in DMF and the solution was degassed with argon (solution 1). CuSO_4 (1 eq. by azide moiety, 0.2 M in HEPES buffer at 100 mM, degassed) was added to 5 eq. of THPTA. Sodium ascorbate (5 eq. by eq. of Cu, 0.2 M in HEPES buffer at 100 mM, degassed) was added to this mixture and the solution was degassed (solution 2). The solution 2 was added to the solution 1 (0.008 M final) and the mixture was degassed. The solution was stirred at room temperature under argon. The completion of the reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm). The product was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm) and lyophilization.

Protocol I: General Procedures for Peptides Syntheses (SPPS)

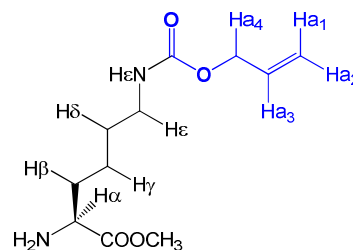
Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertobutyl (Fmoc/tBu) protection strategy. In manual SPPS, device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12 h (typically overnight) with $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with DCM until complete acid trace clearance. The 2-chlorotriptyl resin was preloaded for 30 min in dry DCM with $N\alpha$ -Fmoc-protected amino acid substituted at 1 mmol/g and capped with 6 mL of MeOH/DIPEA/DCM (2/1/17) for 5 min and then one more time for 10 min. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with DCM (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of $N\alpha$ -Fmoc-protected amino acid *in situ* activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with DCM (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by TNBS test. TNBS test required a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF, a solution of DIPEA/DMF (1:9). Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at room temperature for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test). $N\alpha$ -Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\lambda = 7800$

M-1.cm-1). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH.

Automated syntheses of peptide are performed on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) using standard solid-phase methods or on Syro II Synthesizer (Biotage) using standard solid phase methods.

H₂N-Lys(Alloc)-OMe 1

Allylchloroformate (971 μ L, 9.1 mmol) was added slowly to a mixture cooled in an ice bath of Boc-Lys(NH₂)-OH (1.5 g, 6.1 mmol) in water/dioxane (0.15 M, 1:1, 60 mL) and Et₃N (1.7 mL, 12.2 mmol) with stirring. After 3 h of stirring at room temperature, the solution was diluted with water (25 mL) and the pH was acidified to 2 using HCl 1M. The mixture was extracted with ethylacetate (2x60 mL then 1x30 mL) and the combined organic phases were washed with water (30 mL) and brine (30 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to obtain colorless oil which was used without purification. The crude product was dissolved in a solution of MeOH/TMSCl (0.45 M, 7:3, 20 mL). The reaction was stirred for at room temperature overnight. The solution was concentrated under *vacuum* and lyophilized to afford compound 1 (1.6 g, 5.7 mmol) which was used without purification.



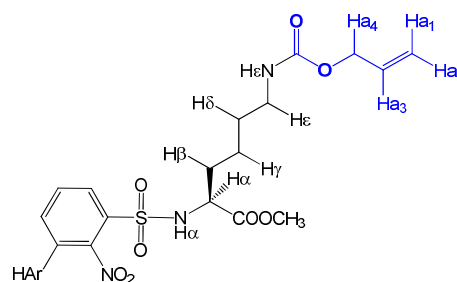
Yield: 93% (2 steps)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.01–5.82 (ddt, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.29 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.20 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 4.79 (s, NH ϵ), 4.55 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 2Ha₄), 3.72 (s, 3H_{OMe}), 3.46 (dd, ³J_{H α -H β} =6.0, 7.0 Hz, 1H α), 3.18 (dd, ³J_{H ϵ -H δ} =7.0, 13 Hz, 2H ϵ), 1.83–1.35 (m, 6H β , γ , δ)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 170.02, 157.17, 132.88, 117.71, 65.86, 53.53, 50.35, 40.40, 29.69, 28.84, 21.98

Ns-Lys(Alloc)-OMe 2

The protocol A was used with compound 1 (1.6 g, 5.7 mmol) to give product 2 (2.38 g, 5.54 mmol).



Yield: 91%

RP-HPLC: RT=12.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

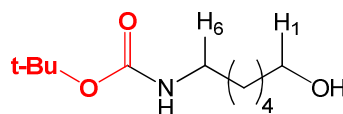
MS (ESI-MS, positive mode): C₁₇H₂₃N₃O₈S M_{calcd}=429.45 g.mol⁻¹ M_{exp}=430.1 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11–8.01 (m, 1HAr), 7.97–7.88 (m, 1HAr), 7.80–7.65 (m, 2HAr), 6.13 (d, ³J_{NH α -H α} =9.0 Hz, NH α), 5.99–5.83 (ddt, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.29 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.20 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 4.79 (s br, NH ϵ), 4.55 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 2Ha₄), 4.16 (td, ³J_{H α -H β} =5 Hz, ³J_{NH α -H α} =9.0 Hz, 1H α), 3.47 (s, 3H_{OMe}), 3.15 (dd, ³J_{H ϵ -H δ} =7.0, 13 Hz, 2H ϵ), 1.90–1.72 (m, 2H β), 1.57–1.37 (m, 4H γ , δ)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 171.54, 156.49, 147.84, 134.24, 133.79, 132.98, 130.61, 125.79, 117.80, 65.68, 60.54, 56.69, 52.50, 40.57, 32.73, 29.36, 21.19

(Boc)-6-aminohexan-1-ol 3

To a solution of 6-aminohexan-1-ol (3 g, 26 mmol) in MeOH (0.2 M, 130 mL), di-*tert*-butyl dicarbonate (6.5 g, 30 mmol) was added. After 8 h of stirring at room temperature, the solution was concentrated in *vaccum*. The residue was dissolved in DCM (150 mL), washed with an aqueous solution brought to pH 3 with HCl (50 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to afford compound 3 (5.15 g, 23.7 mmol).



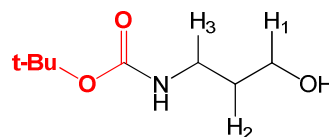
Yield: 91%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.55 (s br, NH), 3.71–3.59 (m, 2H₁), 3.09–3.16 (m, 2H₆), 1.63–1.32 (m, 8H₂₋₅), 1.46 (s, 9H_{tBu})

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 156.22, 62.82, 32.72, 30.21, 28.55, 27.93, 27.55, 26.52, 25.41

(Boc)-3-aminopropan-1-ol 4

The same protocol using for compound 3 was carried out with 3-amino-propan-1-ol as alcohol (2 g, 27 mmol). After treatment compound 4 (4.21 g, 24 mmol) was obtained.

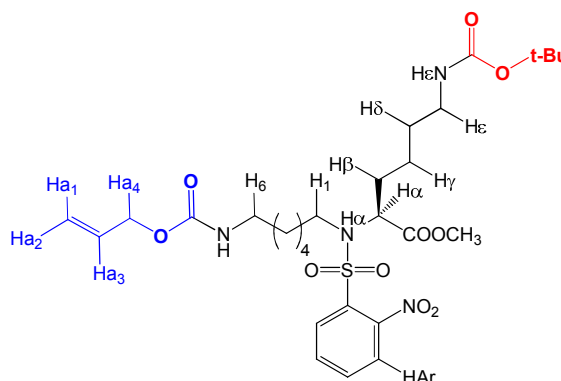


Yield: 89%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.74 (s br, NH), 3.66 (t, ³J_{H1-H2}=6 Hz, 2H₁), 3.33–3.24 (m, 2H₃), 1.66 (dt, ³J_{H1-H2}=6 Hz, ³J_{H2-H3}=12 Hz, 2H₂), 1.45 (s, 9H_{tBu})

(Boc)-(CH₂)₆-N(Ns)-Lys(Alloc)-OMe 5

The protocol B was used with compound **2** (2 g, 4.66 mmol) and compound **3** (1.52 g, 7 mmol). The reaction was monitored by TLC (ethylacetate/cyclohexane, 2:1). The residue was purified by column chromatography (30-40% ethylacetate in cyclohexane) to obtain a mixture of compounds **3** and **4** which was used without further purification.



RP-HPLC: RT=16.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

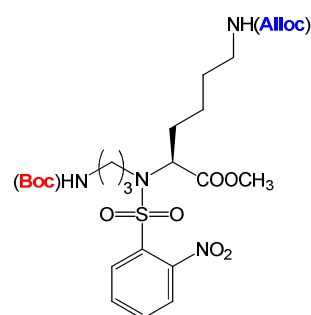
MS (ESI-MS, positive mode): $C_{28}H_{44}N_4O_{10}S$ $M_{calcd}=628.75 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{exp}=629.4 \text{ g.mol}^{-1}$

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.01-8.04 (m, 1Har), 7.70-7.66 (m, 2Har), 7.58-7.55 (m, 1Har), 5.98 (ddt, ³J_{Ha4-Ha3}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.33 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.23 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 4.88 (s br, NHε), 4.56 (d, ³J_{Ha4-Ha3}=5.5 Hz, 2Ha₄+NH_{Boc}), 3.55 (s, 3H_{OMe}), 3.43-3.33 (m, 1Hα), 3.21 (dd, ³J_{He-Hδ}=7.0, 13 Hz, 2Hε), 3.11–3.06 (m, 2H_δ), 3.05–3.02 (m, 1H₁), 2.07–1.96 (m, 1H₁), 1.84–1.74 (m, 2Hβ), 1.62–1.23 (m, 12H_{2-5,γ,δ}), 1.47 (s, 9H_{tBu})

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 171.32, 156.45, 156.17, 148.27, 133.59, 133.11, 131.51, 131.08, 124.06, 117.65, 65.57, 60.40, 52.35, 46.94, 40.79, 40.56, 30.93, 30.06, 29.95, 29.36, 28.56, 26.82, 26.37, 23.40

(Boc)-(CH₂)₃-N(Ns)-Lys(Alloc)-OMe 6

The protocol B was used with compound **2** (691 mg, 1.61 mmol) and compound **4** (422 mg, 2.41 mmol). The reaction was monitored by TLC (ethylacetate/cyclohexane, 3:1). The residue was purified by column chromatography (30-40% ethylacetate in cyclohexane) to obtain a mixture of compounds **4**, **6** and PPh₃O which was used without further purification.

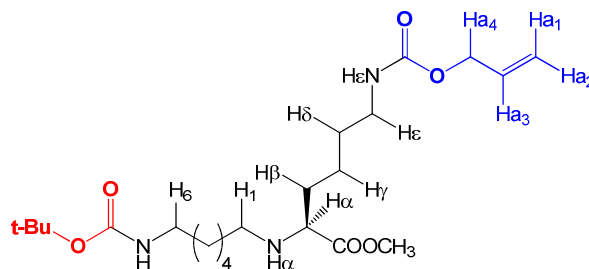


RP-HPLC: RT=12.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₅H₃₈N₄O₁₀S M_{calcd}=586.67 g.mol⁻¹ M_{exp}=587.1 g.mol⁻¹

(Boc)-(CH₂)₆-NH-Lys(Alloc)-OMe 7

The protocol C was applied to the crude product 5. The residue was purified by column chromatography (50% ethylacetate in cyclohexane to 100% ethylacetate) to provide 7 (1.86 g, 4.19 mmol).



Yield: 90% (2 steps)

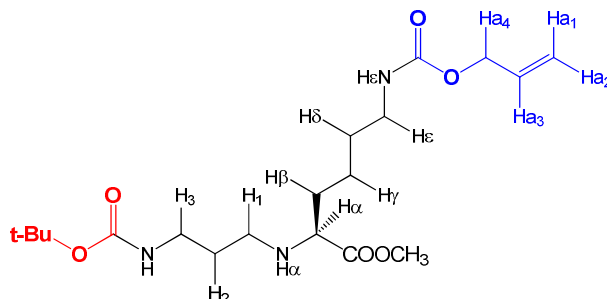
MS (ESI-MS, positive mode): C₂₂H₄₁N₃O₆ M_{calcd}=443.59 g.mol⁻¹ M_{exp}=444.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.91 (ddt, ³J_{Ha4-Ha3}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.29 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.19 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 4.85 (s br, NHε), 4.55 (d, ³J_{Ha4-Ha3}=5.5 Hz, 2Ha₄+NH_{Boc}), 3.73 (s, 3H_{OMe}), 3.26 (t, ³J_{Hα-Hβ}=7 Hz, 1Hα), 3.17 (dd, ³J_{Hε-Hδ}=7.0, 13 Hz, 2Hε), 3.13–3.06 (m, 2H₆), 2.63–2.53 (m, 1H₁), 2.53–2.41 (m, 1H₁), 1.74–1.6 (m, 2Hβ), 1.60–1.24 (m, 12H_{2-5,γ,δ}), 1.44 (s, 9H_{tBu})

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 175.72, 156.42, 156.15, 133.17, 117.69, 68.11, 65.57, 61.44, 60.52, 51.92, 48.23, 40.88, 32.96, 30.12, 29.95, 29.81, 28.58, 26.94, 26.70, 23.06, 21.17

(Boc)-(CH₂)₃-NH-Lys(Alloc)-OMe 8

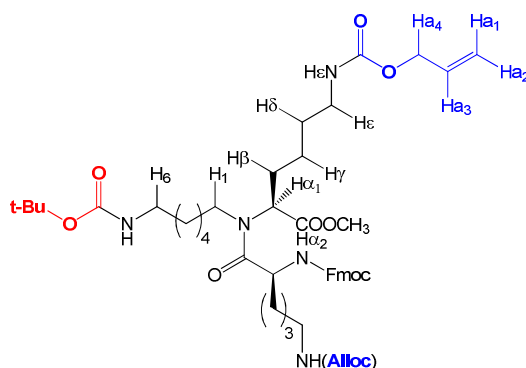
The protocol C was applied with the crude product 6. The residue was purified by column chromatography (50% ethylacetate in cyclohexane to 100% ethylacetate) to provide a mixture of compounds 8 and PPh₃O which was used without further purification.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.92 (ddt, ³J_{Ha4-Ha3}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.30 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.20 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 5.05 (s br, NHε), 4.95 (s br, NH_{Boc}), 4.55 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 2Ha₄), 3.75 (s, 3H_{OMe}), 3.42–3.32 (m, 1Hα), 3.29–3.23 (m, 2H₃), 3.19 (dd, ³J_{Hε-Hδ}=7.0, 13 Hz, 2Hε), 2.86–2.76 (m, 1H₁), 2.66–2.55 (m, 1H₁), 1.96–1.49 (m, 8H_{2,β,γ,δ}), 1.44 (s, 9H_{tBu})

Dipeptide 6C-Boc/2Alloc 9

The protocol D was used with compound **7** (1.86 g, 4.19 mmol) and Fmoc-Lys(Alloc)-OH (4.75 g, 10.48 mmol). The reaction was monitored by TLC (ethylacetate/cyclohexane 2:1). Compound **6** (3.053 g, 3.48 mmol) was obtained after purification by column chromatography (40-50% ethylacetate in cyclohexane).



Yield: 83%

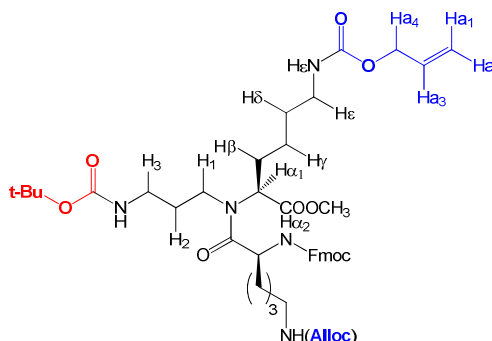
RP-HPLC: RT=18.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₄₇H₆₇N₅O₁₁ M_{calcd}=878.08 g.mol⁻¹ M_{exp}=878.4 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (d, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 7.59 (d, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 7.40 (t, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 7.31 (t, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 5.98–5.81 (m, 2H_{A3}), 5.62 (d, ³J_{NHα-Hα}=7.0 Hz, NH_{α2}), 5.27 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 2H_{A1}), 5.18 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 2H_{A2}), 4.99 (s br, 2NHε), 4.69 (s br, NH_{BOC}), 4.63–4.56 (m, 1Hα), 4.53 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 4H_{A4}), 4.47–4.30 (m, 1Hα+2H_{CH2-Fmoc}), 4.21 (t, ³J=7.0 Hz, 1H_{Fmoc}), 3.69 (s, 3H_{OMe}), 3.46–3.28 (m, 1H_I), 3.26–3.01 (m, 4Hε+2H₆), 2.14–2.02 (m, 1H_I), 1.86–1.30 (m, 20H₂₋₅, β, γ, δ), 1.41 (s, 9H_{tBu})

Dipeptide 3C-Boc/2Alloc 10

The protocol D was executed with half of the crude product **8** (≈ 0.81 mmol) and Fmoc-Lys(Alloc)-OH (916 mg, 2.03 mmol). The completion of reaction was checked by TLC (ethylacetate/cyclohexane 2:1). A blend of product **10** and PPh_3O was obtained after purification by column chromatography (40-50% ethylacetate in cyclohexane) and was used without further purification.



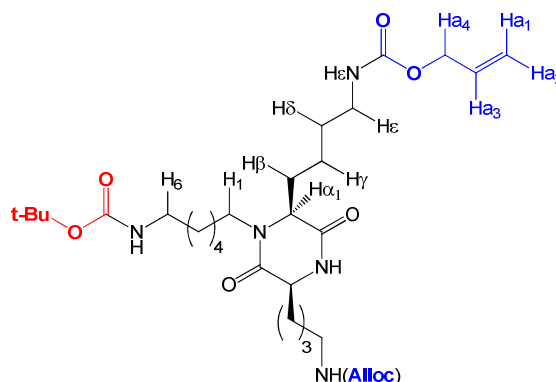
RP-HPLC: RT=17.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : $C_{44}H_{61}N_5O_{11}$ $M_{calcd}=836.00 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{exp}=836.3 \text{ g.mol}^{-1}$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7.76 (d, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 7.59 (d, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 7.40 (t, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 7.31 (t, ³J=7.5 Hz, 2H_{Ar}), 5.96–5.81 (m, 2H_{a3}), 5.55 (s br, NH_{α2}), 5.32–5.23 (m, 2H_{a1}), 5.22–5.14 (m, 2H_{a2}), 5.02 (s br, NH_ε), 4.96 (s br, NH_ε), 4.69–4.58 (m, 1H_α), 4.58–4.46 (m, 4H_{a4}+NH_{Boc}), 4.46–4.29 (m, 1H_α+2H_{CH₂-Fmoc}), 4.22 (t, ³J=7.1 Hz, 1H_{Fmoc}), 3.68 (s, 3H_{OMe}), 3.57–3.42 (m, 1H₁), 3.26–3.07 (m, 4H_ε+2H₃), 1.99–2.08 (m, 1H₁), 1.94–1.48 (m, 14H_{2,β,γ,δ}), 1.43 (s, 9H_{tBu})

D6C-Boc/2Alloc 11

The protocol E was applied to compound 9 (3.053 g, 3.48 mmol). The residue was purified by column chromatography (2-10% MeOH in DCM) to afford compound 11 (1.95 g, 3.13 mmol).



Yield: 90%

RP-HPLC: RT=13.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

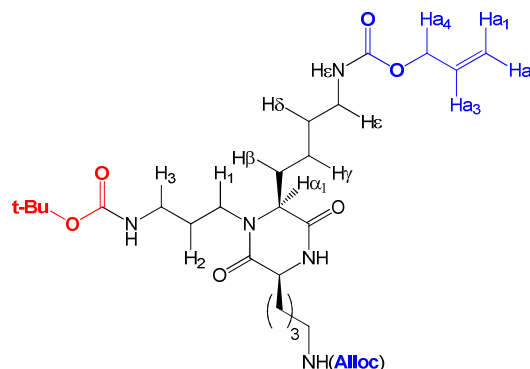
MS (ESI-MS, positive mode) : C₃₁H₅₃N₅O₈ M_{calcd}=623.8 g.mol⁻¹ M_{exp}=624.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.54 (s br, NH_{amide}), 5.99–5.83 (m, 2Ha₃), 5.29 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 2Ha₁), 5.20 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 2Ha₂), 5.00 (s, 2NH_ε), 4.55 (t, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 4Ha₄+NH_{Boc}), 3.95–3.86 (m, 2H_α), 3.86–3.76 (m, 1H₁), 3.25–3.15 (m, 4H_ε), 3.09 (m, 2H₆), 2.90–2.79 (m, 1H₁), 2.03–1.90 (m, 2H_β), 1.68–1.87 (m, 2H_β), 1.58–1.27 (m, 16H_{2-5,γ,δ}), 1.44 (s, 9H_{tBu})

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 168.49, 166.20, 156.43, 155.99, 133.01, 117.34, 78.84, 65.30, 59.34, 55.33, 53.43, 44.72, 40.48, 35.41, 32.65, 29.80, 29.59, 29.16, 28.35, 26.81, 26.41, 26.29, 22.70, 22.39

D3C-Boc/2Alloc 12

The protocol E was used with the crude product 10. The residue was purified by column chromatography (2-10% MeOH in DCM) to provide product 12 (126 mg, 0.217 mmol).



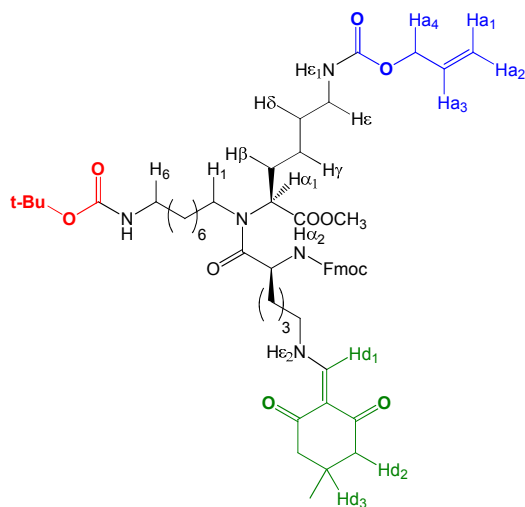
Yield: 27% (4 steps)

RP-HPLC: RT= 12.75 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.21 (s, NH_{amide}), 6.00–5.82 (m, 2Ha₃), 5.30 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 2Ha₁), 5.24–5.17 (m, 2Ha₂), 5.12 (s br, NH_{Boc}), 4.94 (s br, 2NH_ε), 4.56 (m, 4Ha₄), 3.98–3.92 (m, 1H_α), 3.92–3.86 (m, 1H_α), 3.86–3.76 (m, 1H₁), 3.30–3.13 (m, 4H_ε+1H₁), 3.08–2.92 (m, 2H₃), 2.07–1.89 (m, 2H₂), 1.88–1.66 (m, 4H_β), 1.60–1.46 (m, 8H_{γ,δ}), 1.44 (s, 9H_{tBu})

Dipeptide 6C-Boc/Alloc/Dde 13

The protocol D was used with compound 7 (30 mg, 0.068 mmol) and Fmoc-Lys(Dde)-OH (91 mg, 0.17 mmol). The completion of reaction was checked by TLC (ethylacetate/cyclohexane, 2:1). The residue was purified by column chromatography (60% ethylacetate in cyclohexane to 100% ethylacetate) to provide a mixture of product 7 and compound 13.



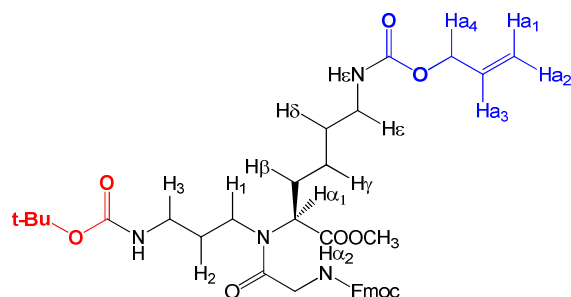
RP-HPLC: RT=18.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₃H₇₅N₅O₁₁ M_{calcd}=958.22 g.mol⁻¹ M_{exp}=958.5 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.47 (s br, NH_{ε2}), 7.76 (d, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 7.59 (d, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 7.40 (t, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 7.30 (t, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 5.89 (ddt, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.63 (s br, NH_{ε1}), 5.27 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.18 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 4.67–4.58 (m, 1H_α), 5.90 (s br, NH_{Boc}), 4.58–4.47 (m, 2Ha₄+1H_α), 4.37 (m, 2H_{CH2-Fmoc}), 4.22 (t, ³J=7 Hz, 1H_{f1}), 3.69 (s, 3H_{OMe}), 3.49–3.36 (m, 2H₆), 3.36–3.27 (m, 1H₁), 3.23–3.12 (m, 2H_ε), 3.12–3.03 (m, 2H_ε), 2.55 (s, 3H_{d1}), 2.38 (s, 4H_{d2}), 2.11–2.05 (m, 1H₁), 1.84–1.29 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}), 1.43 (s, 9H_{tBu}).

Dipeptide 3C-Boc/Alloc 14

The protocol D was executed with a quarter of the crude product 8 (≈0.4 mmol) and Fmoc-Gly-OH (297 mg, 1 mmol). The completion of reaction was checked by TLC (ethylacetate/cyclohexane 3:1). A blend of product 14 and PPh₃O was obtained and used without further purification.

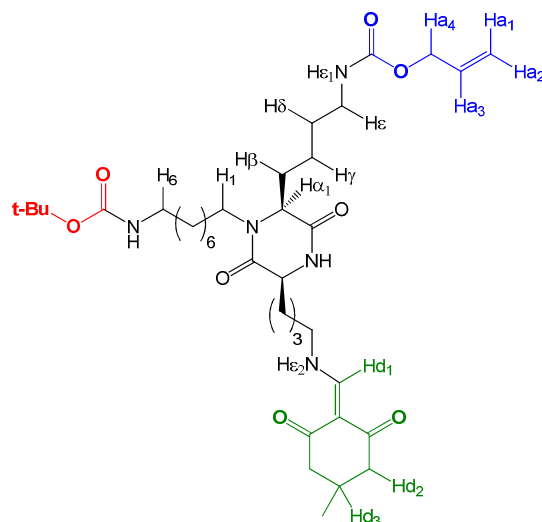


RP-HPLC: RT=16.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₃₆H₄₈N₄O₉ M_{calcd}=680.81 g.mol⁻¹ M_{exp}=681.2 g.mol⁻¹

D6C-Boc/Alloc/Dde 15

The protocol E was executed with the crude product 13. After purification by column chromatography (2-5% MeOH in DCM), the product 16 (15 mg, 0.021 mmol) was obtained.

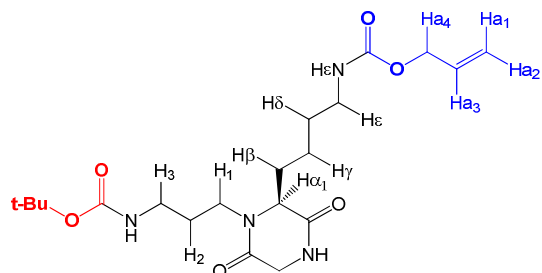


Yield: 31% (2 steps)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.51 (s br, NH_{ε2}), 6.38 (s br, NH_{amide}), 5.98–5.83 (m, 1H_{α3}), 5.29 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1H_{α1}), 5.20 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1H_{α2}), 4.93 (s, NH_{ε1}), 4.56 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 4H_{α4}+NH_{Boc}), 4.00–3.91 (m, 1H_α), 3.90–3.86 (m, 1 H_α), 3.86–3.76 (m, 1H₁), 3.49–3.39 (m, 2H_ε), 3.23–3.14 (m, 2H_ε), 3.09 (t, ³J_{H5-H6}=6 Hz, 2H₆), 2.90–2.78 (m, 1H₁), 2.56 (s, 3H_{d1}), 2.39 (s, 4H_{d2}), 2.07–1.91 (m, 2H_β), 1.65–1.27 (m, 16H_{2-5,γ,δ}), 1.44 (s, 9H_{tBu})

D3C-Boc/Alloc 16

The protocol E was carried out with the crude product 14. The residue was purified by column chromatography (2-10% MeOH in DCM) to provide product 16 (126 mg, 0.217 mmol).



Yield: 27% (4 steps)

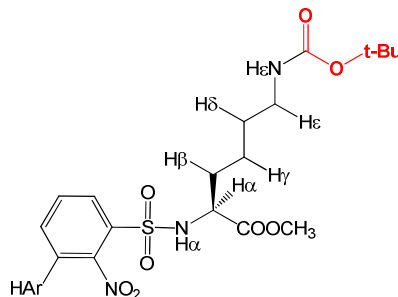
RP-HPLC: RT=10.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₂₀H₃₄N₄O₆ M_{calcd}=426.52 g.mol⁻¹ M_{exp}=427.1 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.94–5.77 (m, 1H_{α3}+NH_{amide}), 5.23 (dq, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1H_{α1}), 5.14 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1H_{α2}), 5.01 (s br, NH_ε), 4.73 (s br, NH_{Boc}), 4.48 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 2H_{α4}), 3.98 (s,), 4.06–3.76 (m, 1H_α+2H_{CH2}+1H₁), 3.25–3.15 (m, 1H₁), 3.12 (dd, ³J_{Hε-Hδ}=7.0, 13 Hz, 2H_ε), 2.98–2.86 (m, 2H₃), 1.94–1.55 (m, 6H_{2,β,γ,δ}), 1.37 (s, 9H_{tBu})

Ns-Lys(Boc)-OMe 17

The protocol A was used with H₂N-Lys(Boc)-OMe (700 mg, 2.36 mmol) to give product 17 (1.03 g, 2.31 mmol).



Yield: 98%

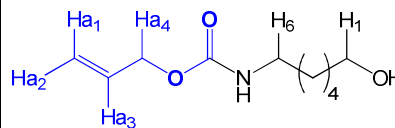
RP-HPLC: RT=13.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₈H₂₇N₃O₈S M_{calcd}=445.5 g.mol⁻¹ M_{exp}=446.1 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10–8.00 (m, 1H_{Ar}), 7.95–7.85 (m, 1H_{Ar}), 7.77–7.66 (m, 2H_{Ar}), 6.11 (d, ³J_{NHα-Hα}=7 Hz, NHα), 4.57 (s br, NHε), 4.20–4.08 (m, 1Hα), 3.46 (s, 3H_{OMe}), 3.07 (m, 2Hε), 1.84 (m, 1Hβ), 1.72 (m, 1Hβ), 1.53–1.35 (m, 4Hγ, δ+9H_{tBu})

(Alloc)-6-aminohexan-1-ol 18

To a solution of 1-aminohexan-1-ol (1 g, 8.55 mmol) and Et₃N (3 mL, 21.35 mmol) in DCM (0.2 M, 42 mL) at 0 °C was added slowly allylchloroformate (1.54 mL, 14.57 mmol) with stirring. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was dissolved in DCM and washed with water, an aqueous solution brought to pH 2 with HCl 1M and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give product 18 (1.56 g, 7.75 mmol).

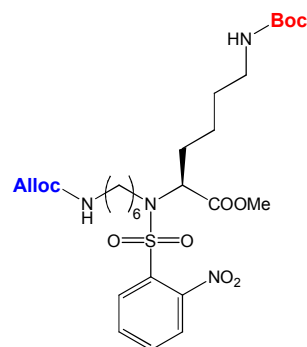


Yield: 91%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.91 (ddt, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₃), 5.29 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1Ha₁), 5.20 (dd, ²J_{Ha1-Ha2}=1.5 Hz, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1Ha₂), 4.74 (s br, NH), 4.55 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 2Ha₄), 3.63 (t, ³J_{H1-H2}=6.5 Hz, 2H₁), 3.18 (dd, ³J_{H5-H6}=6.6 Hz, 13.2 Hz, 2H₆), 1.61–1.45 (m, 4H_{5,2}), 1.43–1.28 (m, 4H_{3,4})

(Alloc)-(CH₂)₆-N(Ns)-Lys(Boc)-OMe 19

The protocol B was applied to compound 17 (1.03 g, 2.31 mmol) and compound 18 (698 mg, 3.47 mmol). The reaction was monitored by TLC (ethylacetate/cyclohexane, 2:1) and analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by column chromatography (40-50% ethylacetate in cyclohexane) to obtain a mixture of compounds 17, 18 and 19 which was used without further purification.

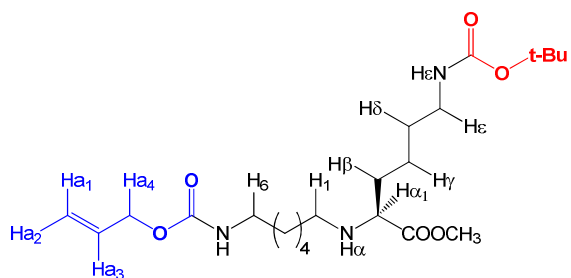


RP-HPLC: RT=16.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₈H₄₄N₄O₁₀S M_{calcd}=628.75 M_{exp}=629.3

(Alloc)-(CH₂)₆-NH-Lys(Boc)-OMe 20

The protocol C was executed with the crude product 19. The completion of the reaction was checked by TLC (ethylacetate/cyclohexane, 2:1). After purification by column chromatography (50% ethylacetate in cyclohexane to 100% ethylacetate) the compound 20 (920 mg, 2.07 mmol) was obtained.



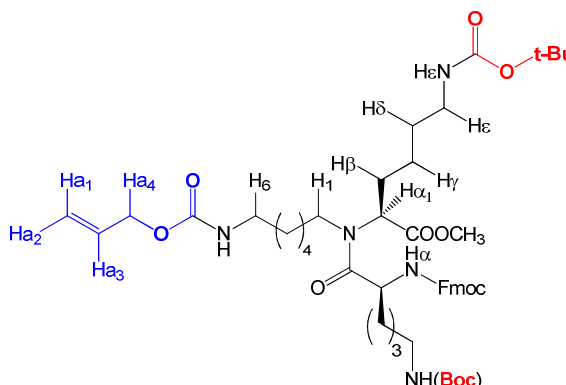
Yield: 90% (2 steps)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.92 (m, 1H_{A3}), 5.29 (d, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1H_{A1}), 5.20 (d, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1H_{A2}), 4.73 (s br, NH), 4.56 (m, 2H_{A4}+NH_{Boc}), 3.71 (s, 3H_{OMe}), 3.27–3.13 (m, 2H_ε+1H_α), 3.12–3.04 (m, 2H_δ), 2.62–2.48 (m, 1H₁), 2.48–2.33 (m, 1H₁), 1.65–1.27 (m, 14H_{2-5,β,γ,δ}), 1.43 (s, 9H_{tBu})

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 176.05, 156.29, 155.96, 133.05, 117.55, 79.02, 65.42, 61.45, 51.66, 48.11, 40.97, 40.36, 33.18, 30.05, 29.91, 29.88, 28.44, 26.22, 26.52, 23.08

Dipeptide 6C-Alloc/2Boc 21

The protocol D was used with compound **20** (920 mg, 2.07 mmol) and Fmoc-Lys(Boc)-OH (2.42 g, 5.18 mmol). The reaction was monitored by TLC (ethylacetate/cyclohexane, 2:1). The residue was purified by column chromatography (50-60% ethylacetate in cyclohexane) to afford compound **21** which was used without further purification.



RP-HPLC: RT=18.95 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

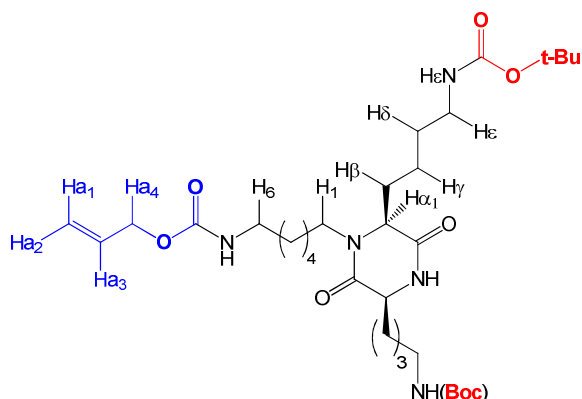
MS (ESI-MS, positive mode): $C_{48}H_{71}N_5O_{11}$ $M_{calcd}=894.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp}=894.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.78 (d, $^3J=7.5 \text{ Hz}$, 2HAr), 7.62 (d, $^3J=7.5 \text{ Hz}$, 2HAr), 7.42 (t, $^3J=7.5 \text{ Hz}$, 2HAr), 7.33 (t, $^3J=7.5 \text{ Hz}$, 2HAr), 6.03–5.81 (m, 1Ha₃), 5.66 (s br, NH_{α2}), 5.31–5.22 (m, 1Ha₁), 5.18 (d, $^3J_{\text{Ha2-Ha3}}=10.5 \text{ Hz}$, 1Ha₂), 5.05 (s br, NH_{Alloc}), 4.81 (s, NH_ε), 4.76 (s, NH_ε), 4.69–4.58 (m, 1H_α), 4.57–4.50 (m, 2Ha₄), 4.49–4.31 (m, 2H_{CH₂-Fmoc}+1H_α), 4.24 (t, $^3J=7 \text{ Hz}$, 1H_{Fmoc}), 3.72 (s, 3H_{OMe}), 3.49–3.32 (m, 1H₁), 3.27–3.01 (m, 4H_ε+2H₆), 2.15–2.00 (m, 1H₁), 1.91–1.31 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}), 1.45 (s, 18H_{tBu})

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 171.36, 156.37, 156.08, 143.20, 141.33, 133.10, 127.73, 127.07, 125.18, 120.00, 117.46, 79.09, 67.07, 65.37, 53.42, 52.29, 51.00, 47.18, 40.74, 40.34, 33.33, 29.84, 28.69, 28.46, 26.32, 26.09, 23.84, 22.32

D6C-Alloc/2Boc 22

The protocol E was applied to the crude compound **21**. The diketopiperazine **22** (1.05 g, 1.65 mmol) was obtained after purification by column chromatography (2-5% MeOH in DCM).



Yield: 80% (2 steps)

RP-HPLC: RT=14.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

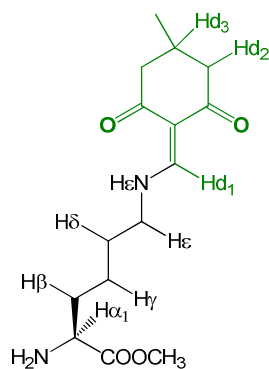
MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_8$ $M_{\text{calcd}}=639.84 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=640.5 \text{ g.mol}^{-1}$

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.78 (s, NH_{amide}), 5.91 (m, 1H_{A3}), 5.29 (d, ³J_{Ha1-Ha3}=17 Hz, 1H_{A1}), 5.20 (d, ³J_{Ha2-Ha3}=10.5 Hz, 1H_{A2}), 4.83 (s br, NH_{Boc}), 4.73 (s br, NHε), 4.68 (s br, NHε), 4.55 (d, ³J_{Ha3-Ha4}=5.5 Hz, 2H_{A4}), 3.96–3.85 (m, 2Hα), 3.85–3.75 (m, 1H₁), 3.23–3.03 (m, 4Hε+2H₆), 2.91–2.77 (m, 1H₁), 2.06–1.24 (m, 20H_{γ-δ,β,γ,δ}), 1.43 (s, 18H_{tBu})

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 167.88, 166.61, 156.07, 133.1, 117.53, 79.15, 65.42, 59.48, 55.75, 44.72, 40.85, 40.16, 35.66, 32.78, 29.83, 28.46, 26.85, 26.41, 26.26, 23.00, 22.58

H₂N-Lys(Dde)-OMe 23

Fmoc-Lys(Dde)-OH (125 mg, 0.23 mmol) was dissolved in a solution of TMSCl/MeOH (0.1 M, 2 mL, 1:1). After 3 h of stirring, the solvents were removed under reduced pressure to afford the crude product Fmoc-Lys(Dde)-OMe. This crude product was dissolved in a piperidine/DMF (0.2 M, 2:8, 1 mL) solution. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under *vacuum*. The residue was purified on column chromatography (2-10% MeOH in DCM) to provide product **23** (50 mg, 0.15 mmol).



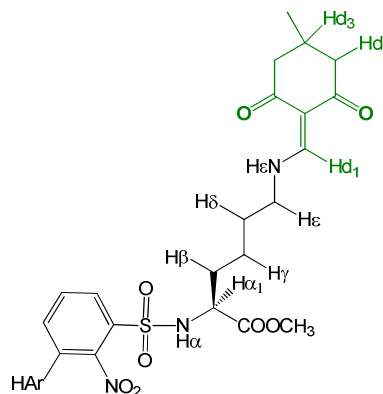
Yield: 65%

RP-HPLC: RT=8.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.45 (s br, NHε), 3.72 (s, 3H_{OMe}), 3.44 (dd, ³J_{Hα-Hβ}=5.5 Hz, =7.0 Hz, 1H_α), 3.42–3.33 (m, 2H_ε), 2.55 (s, 3Hd₁), 2.35 (s, 4Hd₂), 1.84–1.43 (m, 6H_{β,γδ}), 1.02 (s, 6Hd₃).

Ns-Lys(Dde)-OMe 24

The protocol A was used with compound 23 (50 mg, 0.15 mmol) to give product 24 (68 mg, 0.133 mmol).



Yield: 89%

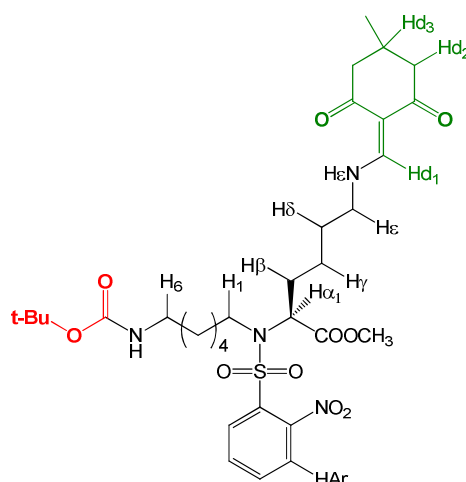
RP-HPLC: RT=13.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₃H₃₁N₃O₈S M_{calcd}=509.58 g.mol⁻¹ M_{exp}=510.2 g.mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 13.47 (s br, NHε), 8.12–8.02 (m, 1HAr), 7.98–7.87 (m, 1HAr), 7.81–7.65 (m, 2HAr), 6.13 (d, ³J_{NHα-Hα}=9 Hz, NHα), 4.17 (td, ³J_{Hα-Hβ}=5.5 Hz, ³J_{NHα-Hα}=9 Hz, 1Hα), 3.49 (s, 3H_{OMe}), 3.39 (dd, ³J_{Hε-Hδ}=7.0, 13 Hz, 2Hε), 2.56 (s, 3Hd₁), 2.37 (s, 4Hd₂), 2.01–1.57 (m, 6Hβ,γ,δ), 1.04 (s, 6Hd₃).

(Boc)-(CH₂)₆-N(Ns)-Lys(Dde)-OMe 25

The protocol B was applied to compounds 24 (68 mg, 0.133 mmol) and 3 (48 mg, 0.22 mmol). The reaction was followed by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by column chromatography (60 to 75% ethylacetate in cyclohexane) to obtain a mixture of compounds 25 and PPh₃O which was used without further purification.



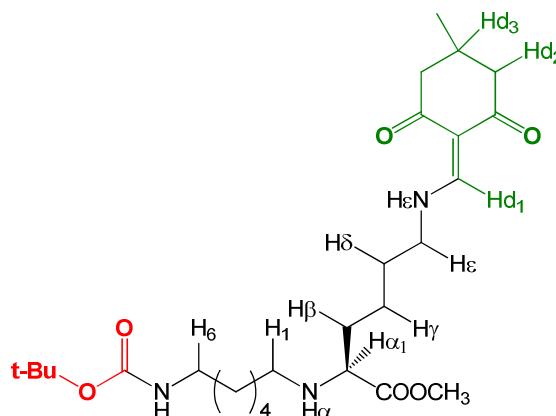
RP-HPLC: RT=17.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₃₄H₅₂N₄O₁₀S M_{calcd}=708.88 g.mol⁻¹ M_{exp}=709.4 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.47 (s br, NH_ε), 8.08–7.39 (m, 4HAr), 4.6 (s br, NH_{Boc}), 3.55 (s, 3H_{OMe}), 3.47–3.34 (m, 2H_ε+1H_α), 3.16–3.00 (m, 1H₁+2H₆), 2.56 (s, 3Hd₁), 2.37 (s, 4Hd₂), 2.15–2.01 (m, 1H₁), 1.89–1.22 (m, 14H_{2-5,β,γ,δ}), 1.45 (s, 9H_{tBu}), 1.04 (s, 6Hd₃).

(Boc)-(CH₂)₆-NH-K(Dde)-OMe 26

The protocol C was executed with compound 25. The completion of the reaction was checked by TLC (DCM/MeOH, 9:1). After purification by column chromatography (2% MeOH in DCM) the compound 26 (42.2 mg, 0.081 mmol) was obtained.



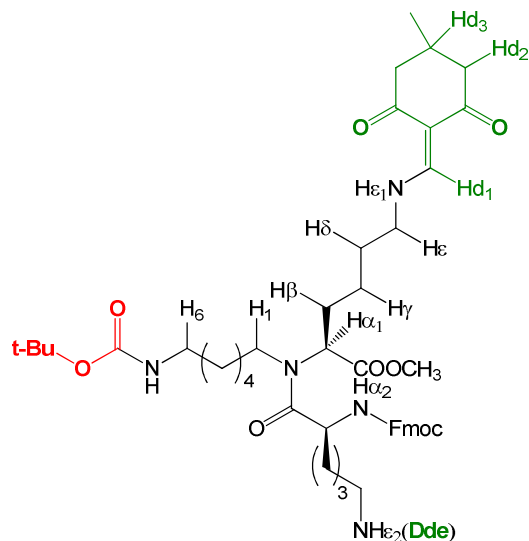
Yield: 61% (2 steps)

RP-HPLC: RT=12.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₂₈H₄₉N₃O₆ M_{calcd}=523.72 g.mol⁻¹ M_{exp}=524.4 g.mol⁻¹

Dipeptide 6C-Boc/2Dde 27

The protocol D was used with compound 26 (42.2 mg, 0.081 mmol) and Fmoc-Lys(Dde)-OH (107 mg, 0.2 mmol) in DMF. The reaction was monitored by TLC (DCM/MeOH, 9:1) and analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by column chromatography (2-5% MeOH in DCM) to afford compound 27 (29 mg, 0.028 mmol).



Yield: 34%

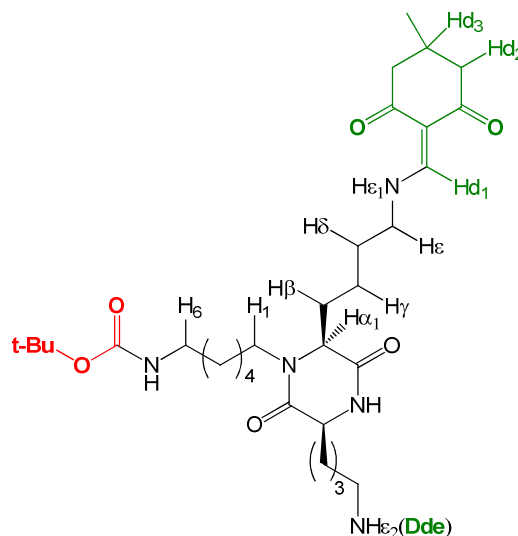
RP-HPLC: RT=19.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₉H₈₃N₅O₁₁ M_{calcd}=1038.35 g.mol⁻¹ M_{exp}=1038.7 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.52–13.39 (m, 2NHε), 7.76 (d, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 7.59 (d, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 7.39 (t, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 7.30 (t, ³J=7.5 Hz, 2HAr), 5.73 (d, ³J_{NHα2-Hα2}=9 Hz, NHα₂), 4.74 (s br, NH_{Boc}), 4.68–4.52 (m, 2H_α), 4.37 (m, 2H_{CH2-Fmoc}), 4.21 (t, ³J=7 Hz, 1H_{Fmoc}), 3.70 (s, 3H_{OMe}), 3.46–3.28 (m, 4Hε), 3.21–3.02 (m, 1H₁+2H₆), 2.54 (s, 3H_{δ1}), 2.52 (s, 3H_{δ1}), 2.35 (s, 4H_{δ2}), 2.33 (s, 4H_{δ2}), 2.16–2.09 (m, 1H₁), 1.94–1.30 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}), 1.41 (s, 9H_{tBu}), 1.01 (s, 3H_{δ3}), 1.00 (s, 3H_{δ3}).

D6C-Boc/2Dde 28

The protocol E was applied to compound 27. The diketopiperazine 28 (11.7 mg, 0.015 mmol) was obtained after purification by column chromatography (2-5% MeOH in DCM).



Yield: 53%

RP-HPLC: RT=15.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₃H₆₉N₅O₈ M_{calcd}=784.06 g.mol⁻¹ M_{exp}=784.6 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.55–13.50 (m, NH_ε), 13.50–13.45 (m, NH_ε), 6.32 (s br, NH_{amide}), 4.57 (s br, NH_{Boc}), 3.95 (dt, ³J_{Hα-Hβ}=4.0, 8.0 Hz, 1H_{α1} or 2), 3.90–3.77 (m, 1H_α+1H₁), 3.41 (dd, ³J_{Hε-Hδ}=7.0, 13 Hz, 4H_ε), 3.09 (dd, ³J_{H5-H6}= 6.5, 13 Hz, 2H₆), 2.89–2.74 (m, 1H₁), 2.56 (s, 3Hd₁), 2.55 (s, 3Hd₁), 2.37 (s, 4Hd₂), 2.35 (s, 4Hd₂), 2.04–1.27 (m, 20H₂₋₅, β, γ, δ), 1.44 (s, 9H_{tBu}), 1.03 (s, 3Hd₃), 1.02 (s, 3Hd₃).

NH₂-KLVFFA-OH 29

The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (1 g, 0.6 mmol/g) using the general procedure (Syro II). 100 mg of resin containing peptide was solved in a TFA/TIS/H₂O (5 mL, 95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with a TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford peptide 29.

RP-HPLC: RT=10.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) :

C₃₈H₅₇N₇O₇ M_{calcd}=723.92 g.mol⁻¹

M_{exp}=724.4 g.mol⁻¹

Boc-K(Boc)LVFFA-OH 30

The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (0.6 mmol/g) using the general procedure I. The resin was solved in DMF and the pH was adjusted to 8 with DIEA. Di-*tert*-butyl dicarbonate (2 eq.) was added and the mixture was stirred for 2h. The resin was washed three times with DMF and twice with DCM. The linear peptide was cleaved from the resin with a TFA/DCM (99/1) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with DCM. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford peptide 30.

RP-HPLC: RT=16.45 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

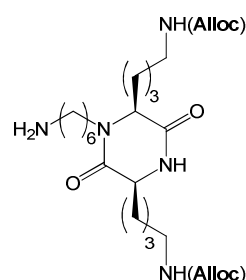
MS (ESI-MS, positive mode): C₄₈H₇₃N₇O₁₁

M_{calcd}=924.16 g.mol⁻¹

M_{exp}=924.5 g.mol⁻¹

D6C-NH₂/2Alloc 31

Compound 11 (100 mg, 0.16 mmol) was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 16 mL, 1:1) solution. The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum* to provide product 31 which was used without further purification.

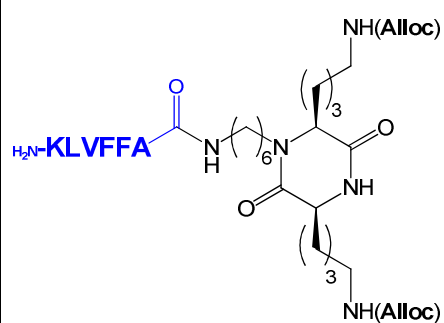


RP-HPLC: RT=13,05 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₆H₄₅N₅O₆ M_{calcd}=523.68 g.mol⁻¹ M_{exp}=524.4 g.mol⁻¹

D6C-AFFVLK/2NH₂ 32

Compound 31 (12 mg, 0.02 mmol) was dissolved in DCM (0.02 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. Peptide 30 (23 mg, 0.024 mmol) and PyBOP (13 mg, 0.024 mmol) were added. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The protocol F was applied to the crude material. The residue was precipitated in DCM/Et₂O. The crude material was dissolved in TFA/DCM (0.01 M, 2 mL, 1:1) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product 32 (7 mg, 5 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min).



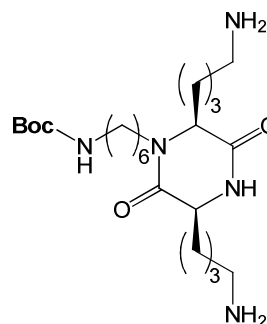
Yield: 25%

RP-HPLC: RT=9.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₆H₉₂N₁₂O₈ M_{calcd}=1061.43 g.mol⁻¹ M_{exp}=1061.7 g.mol⁻¹

D6C-Boc/2NH₂ 33

The protocol F was used with diketopiperazine **11** (200 mg, 0.32 mmol). The residue was filtered on silica gel (5 to 20% MeOH and 1-5% Et₃N in DCM) to give product **33** (100 mg, 0.22 mmol).



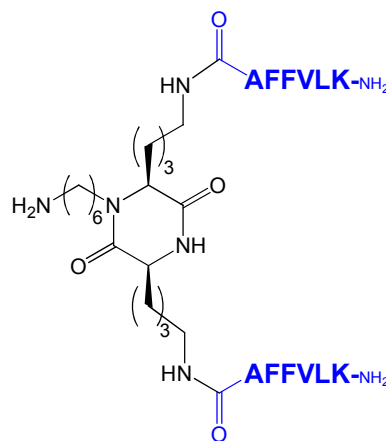
Yield: 69%

RP-HPLC: RT=9.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₃H₄₅N₅O₄ M_{calcd}=455.62 g.mol⁻¹ M_{exp}=456.5 g.mol⁻¹

D6C-NH₂/2AFFVLK 34

Compound **33** (6 mg, 0.013 mmol) was dissolved in a DCM/DMF (0.01 M, 1.5 mL, 2:1) solution and the pH was adjusted to 8-9 with DIEA. Peptide **30** (29 mg, 0.031 mmol) and PyBOP (16 mg, 0.031 mmol) were added to the mixture. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 1.3 mL, 1:1) solution and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product **34** (12 mg, 0.5 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min).



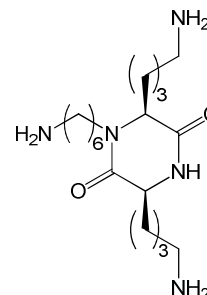
Yield: 39%

RP-HPLC: RT=10.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₉₄H₁₄₇N₁₉O₁₄ M_{calcd}=1767.34 g.mol⁻¹ M_{exp}=1768.1 g.mol⁻¹

D6C-3NH₂ 35

The protocol F was used with diketopiperazine 7 (100 mg, 0.22 mmol). The residue was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 2.2 mL, 1:1) solution. The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum*. The residue was dissolved in an aqueous solution of HCl 1M and the mixture was stirred for 15 min. The aqueous layer was washed twice with DCM and lyophilized to provide product 35 (90 mg, 0.19 mmol).



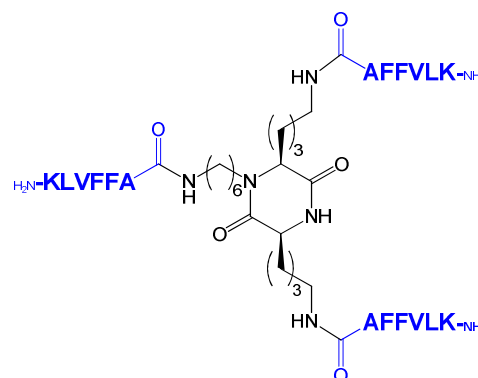
Yield: 88%

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₈H₃₇N₅O₂ M_{calcd}=355.3 g.mol⁻¹ M_{exp}=356.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.18–4.07 (m, 2H_α), 3.84–3.71 (m, 1H₁), 3.17–3.10 (m, 1H₁), 3.10–3.01 (m, 4H_ε+2H₆), 2.22–1.33 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}).

D6C-3AFFVLK 36

Compound 35 (2.8 mg, 6 μmol) was dissolved in DMF (0.006 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 8-9 with DIEA. Peptide 30 (5.5 mg, 0.019 mmol) and PyBOP (10 mg, 0.019 mmol) were added to the mixture. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a TFA/DCM (6 mM, 1 mL, 1:1) solution and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product 36 (13 mg, 4.2 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min)



Yield: 77%

RP-HPLC: RT=11.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₃₂H₂₀₂N₂₆O₂₀ M_{calcd}=2473.24 g.mol⁻¹ M_{exp}=2473.7 g.mol⁻¹

NH₂-SKLVFFA-OH 37

The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (1 g, 0.6 mmol/g) using the general procedure I (Syrö II). 200 mg of resin containing peptide was solved in a TFA/TIS/H₂O (5 mL, 95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with a TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O. This crude material (150 mg) was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) to afford peptide 37.

RP-HPLC: RT=10.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) :
C₁₄H₆₂N₈O₉

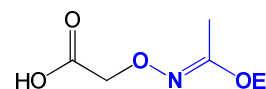
M_{calcd}=811.0 g.mol⁻¹

M_{exp}=811.6 g.mol⁻¹

CHO-KLVFFA-OH <u>38</u>	
CH ₃ CN (800 µL) was added to peptide 37 (10 mg, 11.1 µmol). Buffer A (1.2 mL) then NaIO ₄ (24 mg, 11 µmol) were added and the solution was stirred for 30 min at room temperature. The product 38 (8 mg, 8.8 µmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-70% B in 30 min) and lyophilization.	Yield: 79% RP-HPLC: RT=14.2 min (C18, 214 nm, 5-60% B in 20 min) MS (ESI-MS, positive mode) : C ₄₀ H ₅₉ N ₇ O ₁₀ M _{calcd} =797.96 M _{exp} =798.5
NH₂-VQIVYK-OH <u>39</u>	
The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (1 g, 0.6 mmol/g) using the general procedure (Syrro II). 100 mg of resin containing peptide was solved in a TFA/TIS/H ₂ O (5 mL, 95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with a TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under <i>vacuum</i> . The residue was precipitated in DCM/Et ₂ O and purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) to afford peptide 39 .	RP-HPLC: RT=8.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min) MS (ESI-MS, positive mode) : C ₃₆ H ₆₀ N ₈ O ₉ M _{calcd} =748.93 g.mol ⁻¹ M _{exp} =749.7 g.mol ⁻¹
NH₂-SVQIVYK-OH <u>40</u>	
The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (1 g, 0.6 mmol/g) using the general procedure (Syrro II). 200 mg of resin containing peptide was solved in a TFA/TIS/H ₂ O (5 mL, 95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with a TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under <i>vacuum</i> . The residue was precipitated in DCM/Et ₂ O. This crude material (150 mg) was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) to afford peptide 40 .	RP-HPLC: RT=8.15 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min) MS (ESI-MS, positive mode) : C ₃₉ H ₆₅ N ₉ O ₁₁ M _{calcd} =836.1 g.mol ⁻¹ M _{exp} =836.4 g.mol ⁻¹
CHO-VQIVYK-OH <u>41</u>	
CH ₃ CN (800 µL) was added to peptide 40 (10 mg, 11.1 µmol). H ₂ O (1.2 mL) then NaIO ₄ (24 mg, 11 µmol) were added and the solution was stirred for 30 min at room temperature. The solution was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-70% B in 30 min). The product 41 (6.5 mg, 6.9 µmol) was obtained after lyophilization.	Yield: 62% RP-HPLC: RT=10.7 min (C18, 214 nm, 5-60% B in 20 min) MS (ESI-MS, positive mode) : C ₃₈ H ₆₂ N ₈ O ₁₂ M _{calcd} =822.96 g.mol ⁻¹ M _{exp} =823.6 g.mol ⁻¹

2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid **42**

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature and ethyl *N*-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 h of stirring at 80 °C and cooling to room temperature, water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed three times with DCM. The water phase was brought to pH 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted four times with ethylacetate (NB: After each extraction the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in *vacuum*, providing compound **42** (5.69 g, 35.3 mmol).



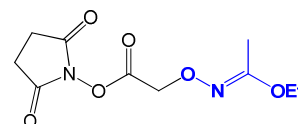
Yield: 73%

MS (ESI-MS, negative mode): C₆H₁₁NO₄ M_{calcd}=161.2 g.mol⁻¹ M_{exp}=161.0 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.48 (s, CH₂), 4.00 (q, ³J=7.2 Hz, O-CH₂-CH₃), 2.01 (s, CH₃), 1.27 (t, ³J=7.2 Hz, O-CH₂-CH₃).

N-hydroxysuccinimidyl-2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate **43**

To a stirred solution of compound **42** (5.69 g, 35.3 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol) in ethylacetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under *vacuum*. The obtained residue was dissolved in ethylacetate (300 mL), and the solution was washed twice with 5% aqueous NaHCO₃, once with water and brine. The organic solution was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under *vacuum* to provide compound NHS-Aoa-Acm **43** (8.69 g, 33.7 mmol).



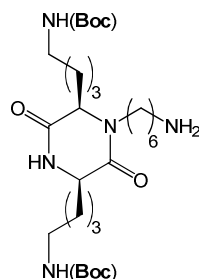
Yield: 95%

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₀H₁₄N₃O₇ M_{calcd}=258.1 g.mol⁻¹ M_{exp}=258.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.78 (s, CH₂), 4.01 (q, ³J=7.2 Hz, O-CH₂-CH₃), 2.84 (s, 2CH₂-NHS), 1.98 (s, CH₃), 1.28 (t, ³J=7.2 Hz, O-CH₂-CH₃).

D6C-NH₂/2Boc 44

The protocol F was used with diketopiperazine **22** (150 mg, 0.23 mmol). The residue was filtered on silica gel (5 to 10% MeOH and 1% Et₃N in DCM) to give product **44** (119 mg, 0.21 mmol).



Yield: 91%

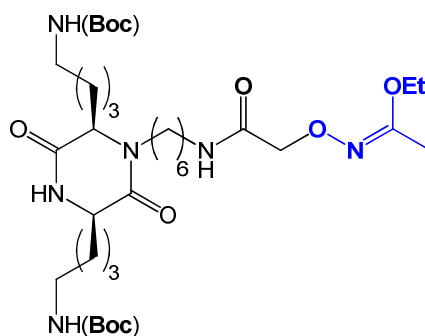
RP-HPLC: RT=11.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₈H₅₃N₅O₆ M_{calcd}=555.76 g.mol⁻¹ M_{exp}=556.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.61 (s, NH_{amide}), 4.73 (s, NH_{Boc}), 4.68 (s, NH_{Boc}), 3.98–3.78 (m, 2H_α+1H₁), 3.21–3.02 (m, 4H_ε), 2.91–2.77 (m, 1H₁), 2.76–2.59 (m, 2H₆), 1.97–1.22 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}), 1.44 (s, 9H_{tBu}), 1.43 (s, 9H_{tBu}).

D6C-Acm/2Boc 45

Compound **44** (28 mg, 0.049 mmol) was dissolved in DMF (0.05 M, 1 mL) and pH was adjusted to 9 with DIEA. NHS-Aoa-Acm **43** (14 mg, 0.055 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (5-100% B in 20 min) and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (2-4% MeOH in DCM) to afford product **45** (22 mg, 0.031 mmol).



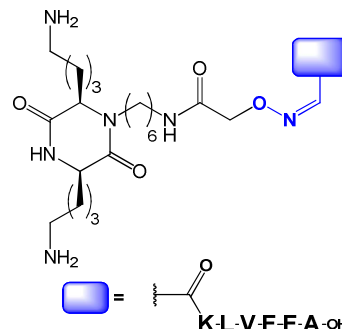
Yield: 63%

RP-HPLC: RT=14.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₃₄H₆₂N₆O₉ M_{calcd}=698.91 g.mol⁻¹ M_{exp}=699.5 g.mol⁻¹

D6C-KLVFFA/2NH₂ 46

The protocol G was applied to diketopiperazine **45** (5.9 mg, 8.4 μmol) and peptide **38** (9.2 mg, 10.1 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-80% B in 20 min). After 1 h the mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-80% B in 30 min). The product **46** (9.4 mg, 6.6 μmol) was obtained after lyophilization.



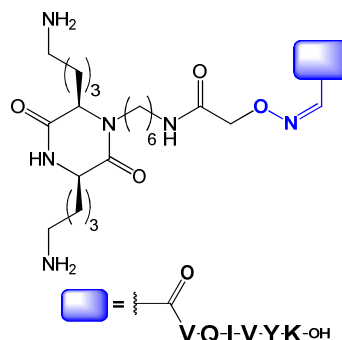
Yield: 78%

RP-HPLC: RT=8.7min (C18, 214 nm, 20-80% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₆₀H₉₅N₁₃O₁₂ M_{calcd}=1190.51 g.mol⁻¹ M_{exp}=1190.8 g.mol⁻¹

D6C-VQIVYK/2NH₂ 47

The protocol G was applied to diketopiperazine **45** (4.7 mg, 6.7 μmol) and peptide **41** (7.5 mg, 8 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-60% B in 20 min). The product **47** (7.9 mg, 5.1 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-60% B in 30 min) and lyophilization.



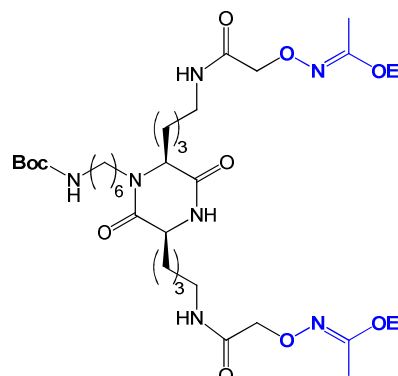
Yield: 76%

RP-HPLC: RT=11.7min (C18, 214 nm, 5-60% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₈H₉₈N₁₄O₁₄ M_{calcd}=1215.51 g.mol⁻¹ M_{exp}=1215.18 g.mol⁻¹

D6C-Boc/2Acm **48**

Compound **33** (50 mg, 0.11 mmol) was dissolved in DMF (0.1 M, 1 mL) and pH was adjusted to 9 with DIEA. NHS-Aoa-Acm **43** (60 mg, 0.23 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (5-100% B in 20 min) and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min) to afford product **48** (44 mg, 0.059 mmol).



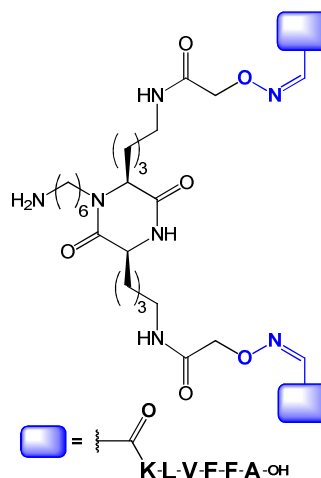
Yield: 54%

RP-HPLC: RT=14.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₃₅H₆₃N₇O₁₀ M_{calcd}=741.93 g.mol⁻¹ M_{exp}=742.3 g.mol⁻¹

D6C-2KLVFFA/NH₂ **49**

The protocol G was applied to diketopiperazine **48** (5.4 mg, 6.5 μmol) and peptide **38** (14 mg, 15.6 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). After 1 h the mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **49** (8.3 mg, 3.5 μmol) was obtained after lyophilization.



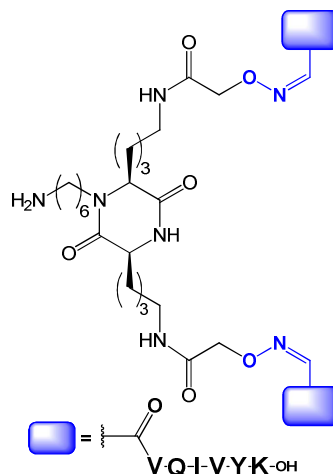
Yield: 54%

RP-HPLC: RT=12.1 min (C18, 214 nm, 20-80% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₀₂H₁₅₃N₂₁O₂₂ M_{calcd}=2025.48 g.mol⁻¹ M_{exp}=2026.4 g.mol⁻¹

D6C-2VQIVYK/NH₂ **50**

The protocol G was applied to diketopiperazine **48** (5.3 mg, 7.2 μ mol) and peptide **41** (16 mg, 17.3 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The product **50** (4.5 mg, 1.9 μ mol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) and lyophilization.



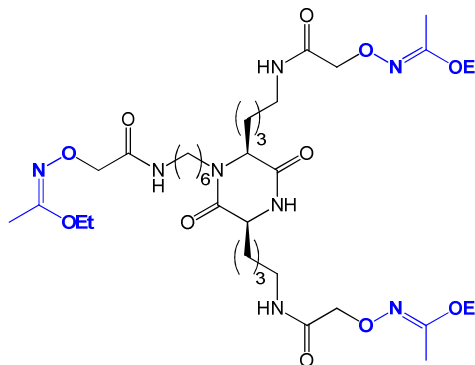
Yield: 26%

RP-HPLC: RT=10 min (C18, 214 nm, 20-80% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₉₈H₁₅₉N₂₃O₂₆ M_{calcd}=2075.5 g.mol⁻¹ M_{exp}=2076.4 g.mol⁻¹

D6C-3Acm **51**

Compound **35** (35 mg, 0.075 mmol) was dissolved in DMF (0.07 M, 1 mL) and pH was adjusted to 9 with DIEA. NHS-Aoa-Acm **43** (64 mg, 0.248 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (5-100% B in 20 min) and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min) to afford product **51** (31 mg, 0.039 mmol).



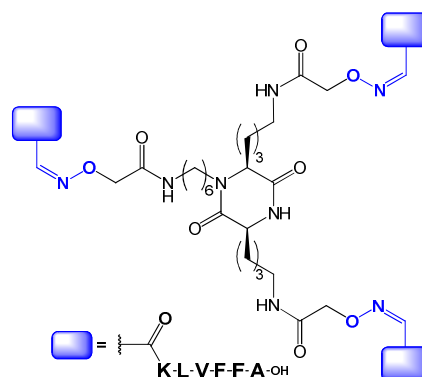
Yield: 52%

RP-HPLC: RT=13.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₃₆H₆₄N₈O₁₁ M_{calcd}=784.96 g.mol⁻¹ M_{exp}=785.6 g.mol⁻¹

D6C-3KLVFFA 52

The protocol G was applied to diketopiperazine 51 (2.9 mg, 3.7 μmol) and peptide 38 (12 mg, 13.3 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The product 52 (4.3 mg, 1.5 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) and lyophilization.



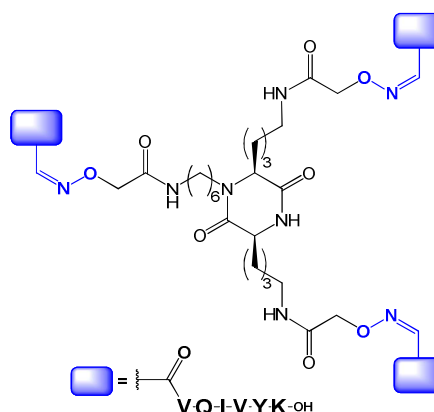
Yield: 40%

RP-HPLC: RT=13.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{144}\text{H}_{211}\text{N}_{29}\text{O}_{32}$ $M_{\text{calcd}}=2860.46 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=2861.2 \text{ g.mol}^{-1}$

D6C-3VQIVYK 53

The protocol G was applied with diketopiperazine 51 (4 mg, 5.1 μmol) and peptide 41 (17 mg, 18.4 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product 53 (3.7 mg, 1.1 μmol) was obtained after lyophilization.



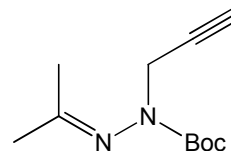
Yield: 22%

RP-HPLC: RT=11.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{138}\text{H}_{220}\text{N}_{32}\text{O}_{38}$ $M_{\text{calcd}}=2935.48 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=2937 \text{ g.mol}^{-1}$

Hydrazine Acétamide-boc-propargyle 54

Solid KOH (252 mg, 4.2 mmol) and tetrabutylammonium hydrogen sulfate (100 mg, 0.3 mmol) were added to a solution of tert-butylisopropylidene carbazate (516 mg, 3 mmol) in toluene (0.3 M, 10 mL). The mixture was stirred vigorously and heated to 50 °C where-upon propargyl bromide was added slowly. The temperature was increased to 80 °C and maintained until the reaction was complete as indicated by TLC (ethylacetate/cyclohexane 1:1). The mixture was cooled and washed with water until the aqueous extract had a neutral pH. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give oil. The product 54 (483 mg, 2.3 mmol) was obtained after purification on column chromatography (ethylacetate/cyclohexane 1:3).

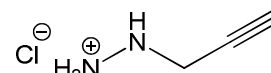


Yield: 77%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.24 (d, J=2.4 Hz, CH₂), 2.17 (t, J=2.5 Hz, CH), 2.09 (s, CH₃), 1.92 (s, CH₃), 1.46 (s, 9H_{tBu}).

Hydrazine propargyle 55

2N HCl (2 acid equiv, 6 mmol, 3 mL) was added to a solution of 54 (483 mg, 2.3 mmol) in THF (0.5 M, 6 mL) and heated for 3 h at reflux. The mixture was cooled and concentrated under *vacuum*. The residue was brought to complete dryness by addition and removal of toluene (three times) to provide product 55 (240 mg, 2.25 mmol).

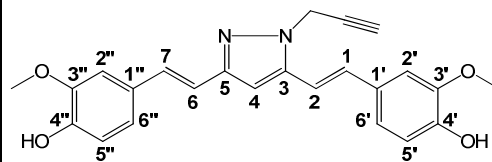


Yield: 98%

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ 3.69 (d, J=2.5 Hz, CH₂), 3.41 (t, J=2.4 Hz, CH).

Curcumin pyrazole **56**

Compound **55** (240 mg, 2.25 mmol) was added to a stirred solution of curcumin (180 mg, 0.5 mmol) in MeOH/AcOH (0.01 M, 50 mL, 9:1). The mixture was stirred at reflux for 5 days. The reaction was monitored by TLC (DCM/MeOH 9:1) and analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The solvent was removed under reduced pressure to yield the crude product, which was further purified by column chromatography (2-10% MeOH in DCM) to afford the product **56** (80 mg, 0.2 mmol).



Yield: 40%

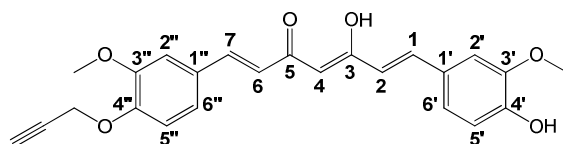
RP-HPLC: RT=12.2 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₄H₂₂N₂O₄ M_{calcd}=402.16 g.mol⁻¹ M_{exp}=403.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (500 MHz, d₆-DMSO) : δ 3.11 (s, 3H_{OMe}), 3.12 (s, 3H_{OMe}), 2.08 (t, 1H, ⁴J = 2 Hz, 1H_{Alcyne}), 4.27 (d, ⁴J = 2 Hz, 2H_{CH₂-C≡C}), 5.98 (d, ³J = 8 Hz, 1H-5''), 5.98 (s, 1H-4), 6.00 (d, ³J = 8 Hz, 1H-5'), 6.06 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H-2), 6.17 (dd, J = 1.8, 8 Hz, 1H-6''), 6.21 (d, ³J = 16 Hz, 1H-2), 6.24 (dd, ³J = 1.8, 8 Hz, 1H-6'), 6.29 (d, ³J = 16.4 Hz, 1H-7), 6.32 (d, ³J = 1.8 Hz, 1H-2'), 6.34 (d, ³J = 16 Hz, 1H-1), 6.40 (d, ³J = 1.8 Hz, 1H-2')

Curcumin propargyle **57**

Curcumin (198 mg, 0.54 mmol) and K₂CO₃ (75 mg, 0.54 mmol) were added to DMF (2.5 mL) followed by 3-bromoprop-1-yne (78 μL, 0.66 mmol). The reaction was monitored by TLC (DCM/MeOH 9:1) and analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The mixture was stirred under argon during 72 h and the solvent was removed under *vacuum*. The product was purified first by column chromatography (10% MeOH in DCM) and then by preparative RP-HPLC (C18, 25-100% B in 30 min) affording compound **57** (37 mg, 0.09 mmol).



Yield: 17%

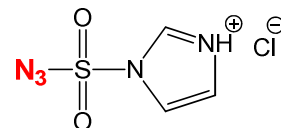
RP-HPLC: RT=15.1 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₄H₂₂O₆ M_{calcd}=406.14 g.mol⁻¹ M_{exp}=407.1 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.53 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 1H_{Alcyne}), 3.93 (s, 3H_{OMe}), 3.95 (s, 3H_{OMe}), 4.80 (d, ⁴J = 2.4 Hz, CH₂-O), 5.82 (s, 1H, H-4), 6.49 (d, ³J = 15.7 Hz, 1H-2 or H-6), 6.51 (d, ³J = 15.7 Hz, H-2 or H-6), 6.89 (d, ³J = 7.9 Hz, H-5' or H-5''), 7.05-7.14 (m, 5H: H-2', H-2'', H-5' or H-5'', H-6', H-6''), 7.60 (d, ³J = 15.7 Hz, H-1+ H-7)

Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride (N₃-SO₂-Imd) **58**

Sulfonyl chloride (16.1 mL, 200 mmol) was added drop-wise to an ice-cooled suspension of NaN₃ (13.0 g, 200 mmol) in CH₃CN (200 mL) and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3 h at room temperature. The mixture was diluted with ethylacetate (400 mL), washed twice with water then twice with saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄ and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the drop-wise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added drop-wise to the filtrate with stirring, the mixture chilled in an ice-bath, filtered and the filter cake washed three times with ethylacetate to give **58** (26.4 g, 0.125 mmol).



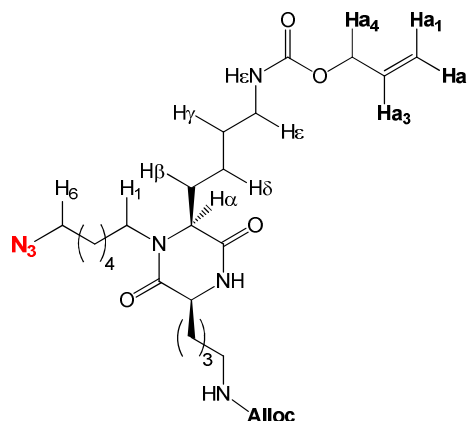
Yield: 63%

MS (ESI-MS, positive mode): C₃H₄ClN₅O₂S M_{calcd}=173.1 g.mol⁻¹ M_{exp}=173.0 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 9.53 (dd, ⁴J_{H1-H3}=1.3 Hz, ⁴J_{H1-H2}=1.6 Hz, 1H₁), 8.09 (1 H, dd, ⁴J_{H1-H3}=1.6 Hz, ³J_{H2-H3}=2.2 Hz, 1H₃), 7.68 (dd, ⁴J_{H1-H3}=1.3 Hz, ³J_{H2-H3}=2.2 Hz, 1H₂).

D6C-N₃/2Alloc **59**

The crude product **31** (0.16 mmol) was dissolved in a DCM/H₂O (0.02 M, 8 mL, 2:1) solution and K₂CO₃ (156 mg, 1.14 mmol) then ZnCl₂ (4.4 mg, 0.032 mmol) were added. Compound N₃-SO₂-Imd **29** (41.5 mg, 0.24 mmol), dissolved in MeOH (0.02 M, 1.2 mL), was added slowly. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the residue dissolved in water. The pH was adjusted to 2 with HCl 1M. The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were pooled then washed with water, brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated on *vacuum*. After lyophilization, product **59** (61 mg, 0.11 mmol) was obtained.



Yield: 69% (2 steps)

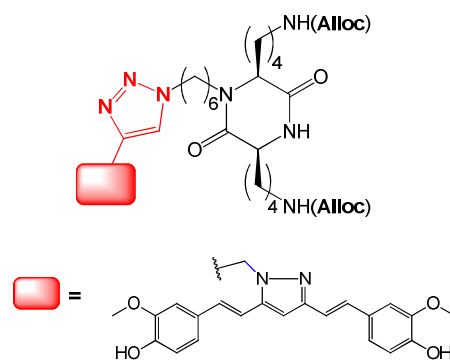
RP-HPLC: RT=13.4 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₆H₄₃N₇O₆ M_{calcd}=549.33 g.mol⁻¹ M_{exp}=550.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.66 (s br, NH_{amide}), 6.02–5.82 (m, 1H_{α3}), 5.35–5.25 (m, 1H_{α1}), 5.24–5.14 (m, 1H_{α2}), 4.96 (s, 2NH_ε), 4.62–4.49 (m, 2H_{α4}), 3.97–3.87 (m, 2H_α), 3.86–3.77 (m, 1H₁), 3.26 (t, ³J_{H5-H6}=7 Hz, 2H₆), 3.23–3.11 (m, 4H_ε), 2.92–2.78 (m, 1H₁), 2.06–1.28 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}).

D6C-CurcPyr/2Alloc 60

Diketopiperazine azide **59** (4 mg, 7.3 μmol) and compound **56** (4.4 mg, 11 μmol) were dissolved in a DMF/water (4:1, 500 μL , 0.015 M) solution. Copper micro-power (0.9 mg, 14.6 μmol) was added and the mixture was stirred over-night. The reaction was monitored in analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The product **60** (2.3 mg, 2.41 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 30-100% B in 30 min) and lyophilization.



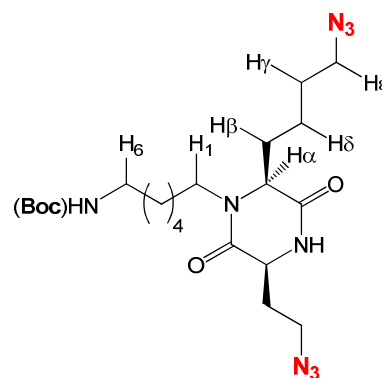
Yield: 33%

RP-HPLC: RT=12.9 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{N}_9\text{O}_{10}$ $M_{\text{calcd}}=952.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=952.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

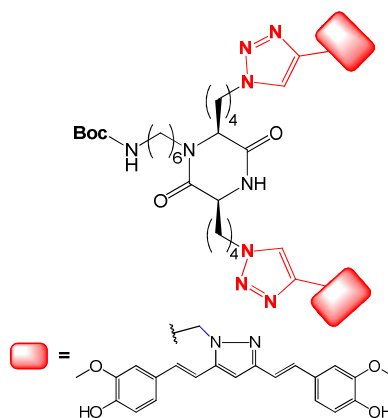
D6C-Boc/2N₃ 61

Compound **33** (100 mg, 0.22 mmol) was dissolved in a DCM/H₂O (0.02 M, 11 mL, 3:2) solution and K₂CO₃ (191 mg, 1.38 mmol) then ZnCl₂ (6 mg, 0.044 mmol) were added. Compound N₃-SO₂-Imd **58** (138 mg, 0.66 mmol) dissolved in MeOH (0.1 M, 6.6 mL), was added slowly. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the residue dissolved in H₂O. The pH was adjusted to 2 with HCl 1M. The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were pooled then washed with H₂O, brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in *vacuum*. After lyophilization, product **61** (69 mg, 0.136 mmol) was obtained.



D6C-Boc/2CurcPyr 62

The protocol H was applied to diketopiperazine azide 61 (4.7 mg, 9 μ mol) and compound 56 (9 mg, 22 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The product 62 (1.6 mg, 1.2 μ mol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 30 min) and lyophilization.



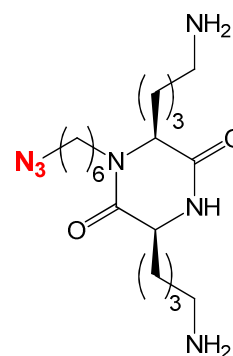
Yield: 13%

RP-HPLC: RT=14.46 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $C_{71}H_{85}N_{12}O_{12}$ $M_{calcd}=1312.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp}=1312.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D6C-N₃/2NH₂ 63

Compound 44 (30 mg, 0.054 mmol) was dissolved in a DCM/H₂O (0.02M, 2.5 mL, 2:1) solution and K₂CO₃ (88 mg, 0.635 mmol) then ZnCl₂ (1.5 mg, 0.011 mmol) were added. Compound N₃-SO₂-Imd 58 (17 mg, 0.081 mmol), dissolved in MeOH (0.02 M, 4 mL), was added slowly. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the residue dissolved in water. The pH was adjusted to 2 with HCl 1M. The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were pooled then washed with water, brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated on *vacuum*. This crude material was purified by preparative RP-HPLC (5-100% B in 30 min). The lyophilized product was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 5.4 mL) solution. After 1 h of stirring at room temperature, the solution was concentrated under reduced pressure. After lyophilization, the product 63 (28 mg, 0.039 mmol) was obtained.



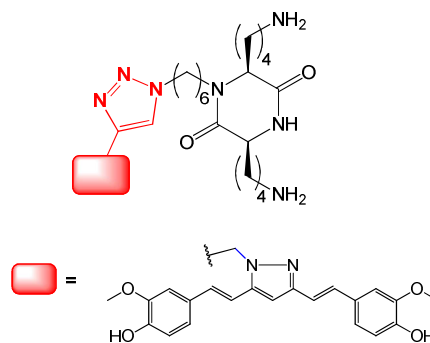
Yield: 72% (2 steps)

RP-HPLC: RT=8.16 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $C_{18}H_{35}N_7O_2$ $M_{calcd}=381.53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp}=382.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D6C-CurcPyr/2NH₂ 64

The protocol H was applied to diketopiperazine azide 63 (5 mg, 8.2 μ mol) and compound 56 (6.8 mg, 17 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 30 min). The product 64 (2.7 mg, 2.7 μ mol) was obtained after lyophilization.



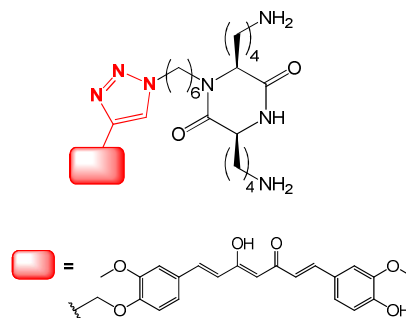
Yield: 32%

RP-HPLC: RT=9.6 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₂H₅₇N₉O₆ M_{calcd}=783.98 M_{exp}=784.3

D6C-Curc/2NH₂ 65

The protocol H was applied to diketopiperazine azide 63 (5 mg, 8.2 μ mol) and compound 57 (10 mg, 25 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 30 min). The product 65 (1.6 mg, 1.6 μ mol) was obtained after lyophilization.



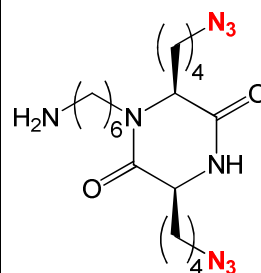
Yield: 20%

RP-HPLC: RT=11.3 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₂H₅₇N₇O₈ M_{calcd}=787.96 M_{exp}=788.3

D6C-NH₂/2N₃ 66

Compound **33** (73 mg, 0.16 mmol) was dissolved in a DCM/H₂O (0.02 M, 8 mL, 3:2) solution and K₂CO₃ (156 mg, 1.14 mmol) then ZnCl₂ (4.4 mg, 0.032 mmol) were added. Compound N₃-SO₂-Imd **58** (83 mg, 0.48 mmol) dissolved in MeOH (0.02 M, 3 mL), was added slowly. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the residue dissolved in H₂O. The pH was adjusted to 2 with HCl 1M. The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were pooled then washed with H₂O, brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated on *vacuum*. This crude material was purified by preparative RP-HPLC (5-100% B in 30 min). The lyophilized product was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 5.4 mL) solution. After 1 h of stirring at room temperature, the solution was concentrated under reduced pressure. After lyophilization, product **66** (50 mg, 0.096 mmol) was obtained.



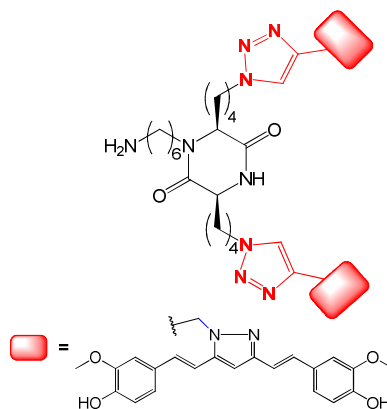
Yield: 60% (2 steps)

RP-HPLC: RT=10.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₈H₃₃N₉O₂ M_{calcd}=407.52 g.mol⁻¹ M_{exp}=408.3 g.mol⁻¹

D6C-NH₂/2CurcPyr 67

The protocol H was applied to diketopiperazine azide **66** (3.4 mg, 6.6 μmol) and compound **56** (6.4 mg, 16 μmol). The reaction was followed by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-100% B in 30 min). The product **67** (2.9 mg, 2.2 μmol) was obtained after lyophilization.



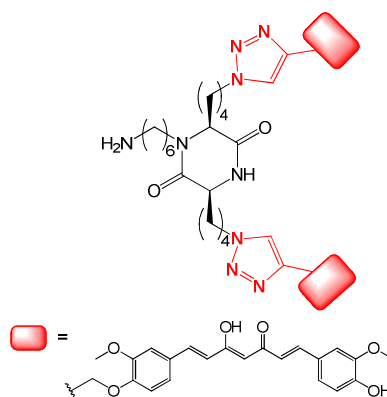
Yield: 33%

RP-HPLC: RT=11.9 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₆₆H₇₇N₁₃O₁₀ M_{calcd}=1212.43 g.mol⁻¹ M_{exp}=1212.8 g.mol⁻¹

D6C-NH₂/2Curc 68

The protocol H was applied to diketopiperazine azide **66** (3.4 mg, 6.6 μ mol) and compound **57** (6.4 mg, 16 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-100% B in 30 min). The product **68** (0.91 mg, 0.6 μ mol) was obtained after lyophilization.



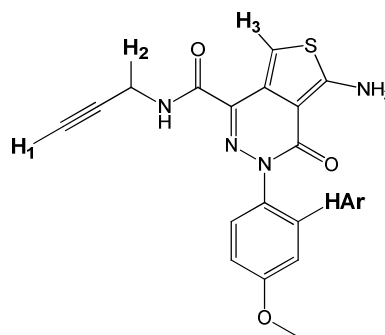
Yield: 9%

RP-HPLC: RT=13.4 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₆₆H₇₇N₉O₁₄ M_{calcd}=1220.4 g.mol⁻¹ M_{exp}=1220.7 g.mol⁻¹

ATPZ propargyle 69

Propargyl amine (10 μ L mg, 0.165 mmol) was added to a mixture of ATPZ (35 mg, 11 mmol) and PyBOP (86 mg, 0.165 mmol) in DMF (0.01 M, 11 mL). The pH was adjusted to 8-9 with DIEA. The mixture was stirred for 2 h. The reaction was monitored by TLC (DCM/MeOH 5:1). The mixture was diluted in DCM, washed once with 5% aqueous NaHCO₃ and water. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in ethanol to give product **69** (20 mg, 0.056 mmol).



Yield: 51%

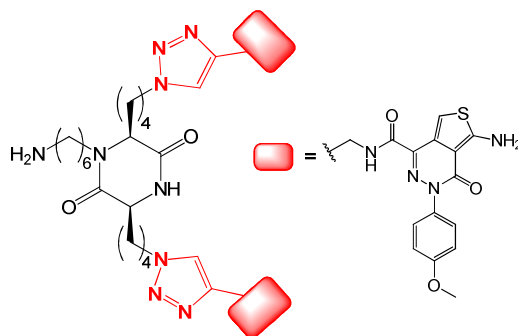
RP-HPLC: RT=12.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₇H₁₄N₄O₃S M_{calcd}=354.38 g.mol⁻¹ M_{exp}=355 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, *d6*-DMSO): δ 8.62 (t, ³J_{NH-H2}=6 Hz, NH_{amide}), 7.54 (s br, NH₂), 7.51 (d, ³J=9 Hz, 2HAr), 7.22 (s, 1H₃), 7.01 (d, J=9.0 Hz, 2HAr), 3.98 (dd, ⁴J_{H1-H2}=2.5 Hz, ³J_{NH-H2}=6 Hz, 2H₂), 3.80 (s, OCH₃), 3.07 (t, ⁴J_{H1-H2}=2.5 Hz, 1H₁).

D6C-ATPZ/2NH₂ 70

The protocol H was applied to diketopiperazine azide **63** (5.1 mg, 8.4 μ mol) and compound **69** (3 mg, 8.6 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **70** (2.3 mg, 2.4 μ mol) was obtained after lyophilization.



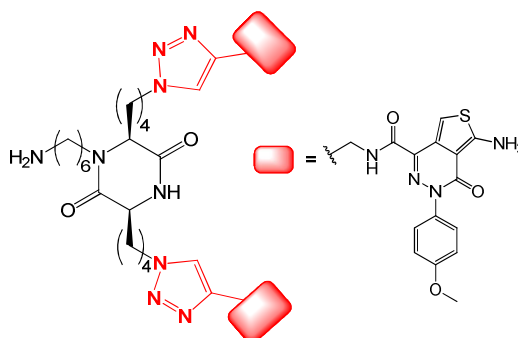
Yield: 29%

RP-HPLC: RT=10.2 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₃₅H₄₉N₁₁O₅S M_{calcd}=735.92 M_{exp}=736.3

D6C-NH₂/2ATPZ 71

The protocol H was applied to diketopiperazine azide **66** (2.8 mg, 5.4 μ mol) and compound **69** (4.6 mg, 13 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **71** (1.2 mg, 1 μ mol) was obtained after lyophilization.



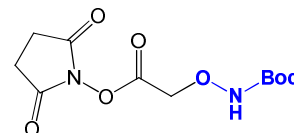
Yield: 19%

RP-HPLC: RT=12 min (C18, 214 nm, 15-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₂H₆₁N₁₇O₈S₂ M_{calcd}=1116.3 g.mol⁻¹ M_{exp}=1116.3 g.mol⁻¹

***N'*-Boc-aminoxyacetyl-*N*-Hydroxysuccinimide Ester (NHS-ONH(Boc)) 72**

To a stirred solution of N-Boc-aminoxyacetic acid (500 mg, 2.6 mmol) in ethylacetate/dioxane (1:1, 10 mL) cooled on an ice bath were added *N*-hydroxysuccinimide (0.310 g, 2.7 mmol) and DCC (0.563 g, 2.7 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h and was then filtered through a pad of Celite, and the filtrate was concentrated under *vacuum*. The obtained residue was dissolved in ethylacetate (35 mL) and washed twice with 5% aqueous NaHCO₃, once with water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated in *vacuum*. The crude solid was re-crystallized from DCM/Et₂O/pentane, providing pure compound **72** (0.618 g, 2.14 mmol).



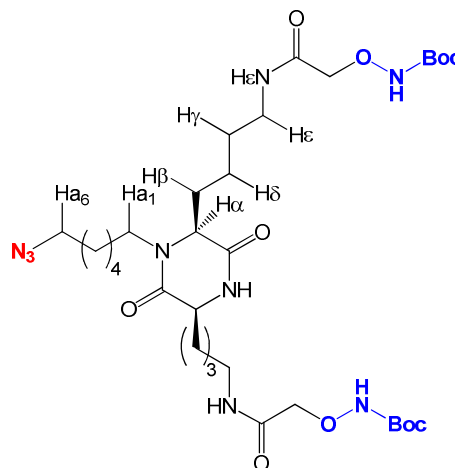
Yield: 83%

MS (ESI-MS, negative mode): $C_{11}H_{16}N_2O_7$ $M_{calcd}=288.1\text{ g.mol}^{-1}$ $M_{exp}=305.8\text{ g.mol}^{-1}$ (M + NH₄)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (s, NH_{Boc}), 4.78 (s, CH₂), 2.87 (s, 2CH₂-NHS), 1.49 (s, 9H_{tBu}).

D6C-N₃/2ONH(Boc) 73

Compound **63** (117 mg, 0.191mmol) was dissolved in DMF (0.05 M, 4 mL) and pH was adjusted to 9 with DIEA. NHS-ONH(Boc) **72** (121 mg, 0.42 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (5-100% B in 20 min) and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in ethylacetate and washed once with 10% citric acid aqueous solution and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (DCM to 5% MeOH in DCM) to afford product **73** (107 mg, 0.147 mmol).



Yield: 67%

RP-HPLC: RT=13.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₃₂H₅₇N₉O₁₀ M_{calcd}=727.6 g.mol⁻¹ M_{exp}=728.7 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.57 (s br, NHε), 8.19 (s br, NHε), 8.15 (s, 2NH_{Boc}), 7.66 (s br, NH_{amide}), 4.41–4.23 (m, 4H_{7,8}), 4.01–3.89 (m, 2Hα), 3.88–3.75 (m, 1H₁), 3.46–3.20 (m, 4Hε, 2H₆), 2.91–2.77 (m, 1H₁), 2.13–1.26 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}), 1.47 (s, 9H_{tBu}), 1.46 (s, 9H_{tBu}).

D6C-1N₃/2KLVFFA 74

The protocol G was applied with diketopiperazine **73** (3.3 mg, 4.5 μ mol) and peptide **38** (10 mg, 11 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **74** (4.7 mg, 2.1 μ mol) was obtained after lyophilization.

Yield: 47%

RP-HPLC: RT=13.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₀₂H₁₅₁N₂₃O₂₂
M_{calcd}=2051.48 g.mol⁻¹ M_{exp}=2501.4 g.mol⁻¹

D6C-1Curc/2KLVFFA 75

The protocol H was applied to diketopiperazine azide **74** (4.7 mg, 2.1 μ mol) and compound **57** (1 mg, 2.52 μ mol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **75** (1.2 mg, 1 μ mol) was obtained after lyophilization.

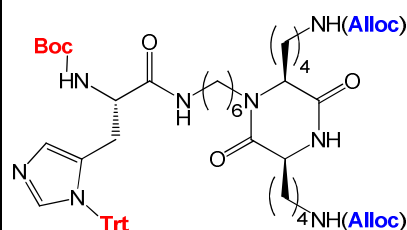
Yield: 16%

RP-HPLC: RT=13.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₂₆H₁₇₃N₂₃O₂₈
M_{calcd}=2457.92 g.mol⁻¹ M_{exp}=2457.4 g.mol⁻¹

D6C-(Boc)His(Trt)/2Alloc 76

Compound **11** (37 mg, 0.06 mmol) was dissolved in TFA/DCM (1:1, 0.01 M, 6 mL). The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum* to provide oil which was used without further purification. This crude material (0.06 mmol) was dissolved in DCM (0.02 M, 3 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. Boc-His(Trt)-OH (36 mg, 0.072 mmol) and PyBOP (37 mg, 0.072 mmol) were added. The completion of reaction was checked by HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The solution was diluted with DCM and washed twice with saturated NaHCO₃, once with water and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to provide product **76** (30 mg, 0.03 mmol).



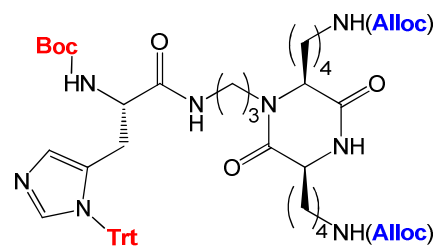
Yield: 50% (2 steps)

RP-HPLC: RT=15.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₆H₇₄N₈O₉ M_{calcd}=1003.26 g.mol⁻¹ M_{exp}=1003.6 g.mol⁻¹

D3C-(Boc)His(Trt)/2Alloc 77

Diketopiperazine 12 (10 mg, 0.017 mmol) was dissolved in TFA/DCM (0.01 M, 1.7 mL, 1:1). The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum* to provide oil which was used without further purification. This crude material (10 mg, 0.017 mmol) was dissolved in DCM (0.017 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. Boc-His(Trt)-OH (10 mg, 0.02 mmol) and PyBOP (10 mg, 0.02 mmol) were added. The completion of reaction was checked by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The solution was diluted with DCM and washed twice with saturated NaHCO₃, once with water and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give crude product 77.

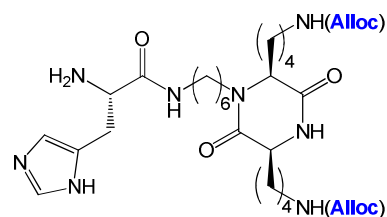


RP-HPLC: RT=15.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₃H₆₈N₈O₉ M_{calcd}=961.18 g.mol⁻¹ M_{exp}=961.7 g.mol⁻¹

D6C-His/2Alloc 78

The product 76 (20 mg, 0.02 mmol) was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 2 mL, 1:1) solution. The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. This crude material was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214nm, 5-100% B in 30 min) affording product 78 (9.1 mg, 0.011 mmol).



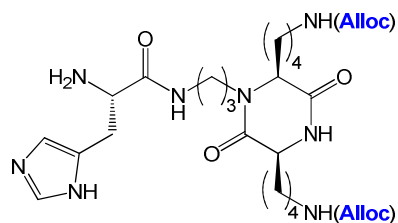
Yield: 53%

RP-HPLC: RT=10 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₃₂H₅₂N₈O₇ M_{calcd}=660.82 g.mol⁻¹ M_{exp}=661.4 g.mol⁻¹

D3C-His/2Alloc 79

The same protocol used to obtain 77 was used with compound 12 (7 mg, 12 μmol). The obtained crude material was dissolved in TFA/DCM (0.01 M, 1.2 mL). The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum*. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214nm, 5-100% B in 30 min) to give product 81 (7 mg, 9 μmol).



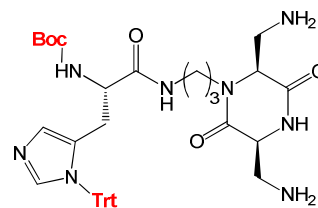
Yield: 75% (3 steps)

RP-HPLC: RT=9.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₉H₄₆N₈O₇ M_{calcd}=618.74 g.mol⁻¹ M_{exp}=619.3 g.mol⁻¹

D3C-(Boc)His(Trt)/2NH₂ 80

The procedure F was applied to the crude material 77 (≈ 0.17 mmol). The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford the crude product 80.

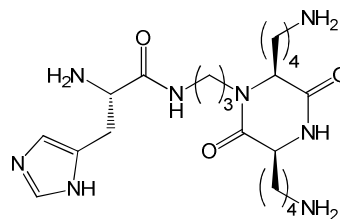


RP-HPLC: RT=11.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₅H₆₀N₈O₅ M_{calcd}=793.03 g.mol⁻¹ M_{exp}=793.6 g.mol⁻¹

D3C-His/2NH₂ 81

The same protocol used to obtain 80 was used with compound 12 (8 mg, 14 μ mol). The obtained crude material was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 1.2 mL) solution. The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum*. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) to give product 83 (5 mg, 6 μ mol).



Yield: 45% (2 steps)

RP-HPLC: RT=1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₁H₃₈N₈O₃ M_{calcd}=450.59 g.mol⁻¹ M_{exp}=451.3 g.mol⁻¹

NH₂-HKLVFFA-OH 82

The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (1 g, 0.6 mmol/g) using the general procedure (OMEGA). 100 mg of resin containing peptide was solved in a TFA/TIS/H₂O (5 mL, 95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with a TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford peptide 82.

RP-HPLC: RT=6.85 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₄H₆₄N₁₀O₈

M_{calcd}=861.1 g.mol⁻¹

M_{exp}=861.5 g.mol⁻¹

NH₂-HVQIVYK-OH 83

The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (1 g, 0.6 mmol/g) using the general procedure (Syro II). 100 mg of resin containing peptide was solved in a TFA/TIS/H₂O (5 mL, 95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with a TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford peptide 83.

RP-HPLC: RT=6.85 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

C₄₂H₆₇N₁₁O₁₀

M_{calcd}=887.1 g.mol⁻¹

M_{exp}=886.6 g.mol⁻¹

Boc-VQ(Trt)IVY(tBu)K(Boc)-OH 84

The peptide was assembled on 2-chlorotrityl resin (0.6 mmol/g) using the general procedure I. The resin was solved in DMF and the pH was adjusted to 8 with DIEA. Di-*tert*-butyl dicarbonate (2 eq.) was added and the mixture was stirred for 2h. The resin was washed three times with DMF and twice with DCM. The linear peptide was cleaved from the resin with a TFA/DCM (99/1) solution. The mixture was stirred for 1 h at room temperature and the resin was washed five times with DCM. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford peptide 84.

RP-HPLC: RT=15.7 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):

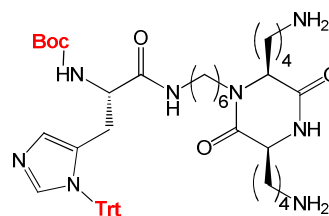
C₆₉H₉₈N₈O₁₃

M_{calcd}=1247.6 g.mol⁻¹

M_{exp}=1247.8 g.mol⁻¹

D6C-(Boc)His(Trt)/2NH₂ 85

The procedure F was applied to the crude material 77 (10 mg, 0.01 mmol). The residue was precipitated in DCM/Et₂O to afford the crude product 85.

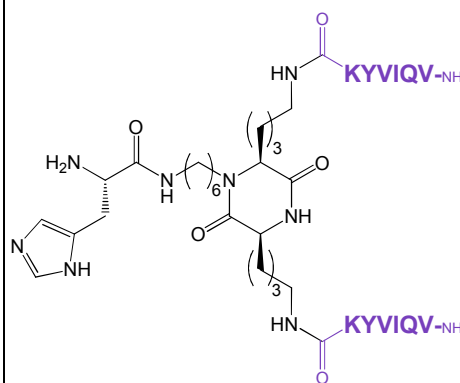


RP-HPLC: RT=12.1 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₈H₆₆N₈O₅ M_{calcd}=835.11 g.mol⁻¹ M_{exp}=835.4 g.mol⁻¹

D6C-His/2KYVIQV 86

Compound 85 (≈0.01 mmol) was dissolved in a DCM (0.01 M, 1mL) solution and the pH was adjusted to 8-9 with DIEA. Peptide 84 (31 mg, 0.025 mmol) and PyBOP (13 mg, 0.025 mmol) were added to the mixture. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 1 mL, 1:1) solution and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product 34 (15.2 mg, 5.8 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min).



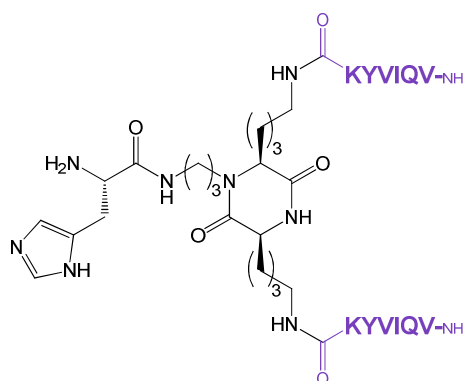
Yield: 23% (3 steps)

RP-HPLC: RT=8.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₉₆H₁₆₀N₂₄O₁₉ M_{calcd}=1954.45 g.mol⁻¹ M_{exp}=1954.1 g.mol⁻¹

D3C-His/2KYVIQV 87

Compound 85 (≈ 0.017 mmol) was dissolved in a DCM (0.01 M, 1.7 mL) solution and the pH was adjusted to 8-9 with DIEA. Peptide 85 (54 mg, 0.043 mmol) and PyBOP (22 mg, 0.043 mmol) were added to the mixture. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 1.7 mL, 1:1) solution and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product 34 (5.2 mg, 2 μ mol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min).



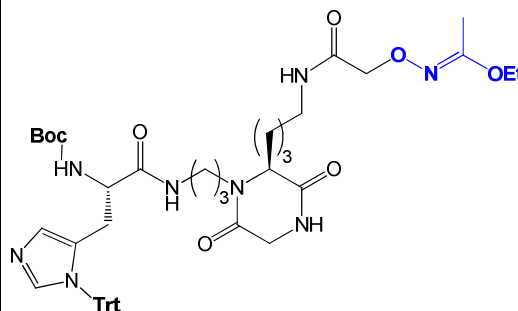
Yield: 12% (5 steps)

RP-HPLC: RT=9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $C_{93}H_{154}N_{24}O_{19}$ $M_{calcd}=1912.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp}=1912.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D3C-(Boc)His(Trt)/Acm 88

Diketopiperazine 16 (20 mg, 0.047 mmol) was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 4.7 mL, 1:1) solution. The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum* to provide oil which was used without further purification. This crude material was dissolved in DCM (0.05 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. Boc-His(Trt)-OH (28 mg, 0.056 mmol) and PyBOP (29 mg, 0.056 mmol) were added. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min, RT=14 min). The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was precipitated in DCM/Et₂O. The protocol F was applied to the crude product. The residue was precipitated in DCM/Et₂O. The product (0.023 mmol) was dissolved in DMF and the pH was adjusted to 9 with DIEA. NHS-Aoa-Acm 43 (6 mg, 0.023 mmol) was added and the solution was stirred 2h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was precipitated in DCM/Et₂O to provide product 88 (16 mg, 0.018 mmol).



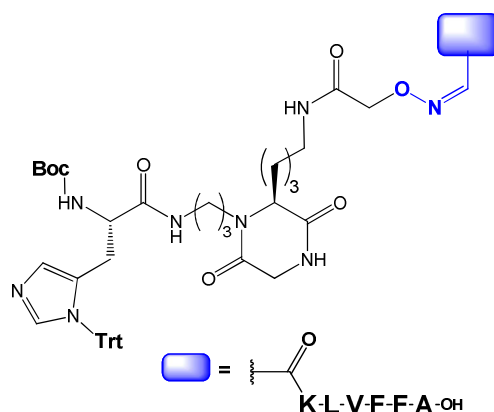
Yield: 39% (4 steps)

RP-HPLC: RT=14.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $C_{47}H_{60}N_8O_8$ $M_{calcd}=865.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{exp}=865.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D3C-His/KLVFFA 89

The protocol G was applied to diketopiperazine **88** (5 mg, 5.8 μmol) and peptide **38** (6.4 mg, 7 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **89** (2.5 mg, 1.6 μmol) was obtained after lyophilization.



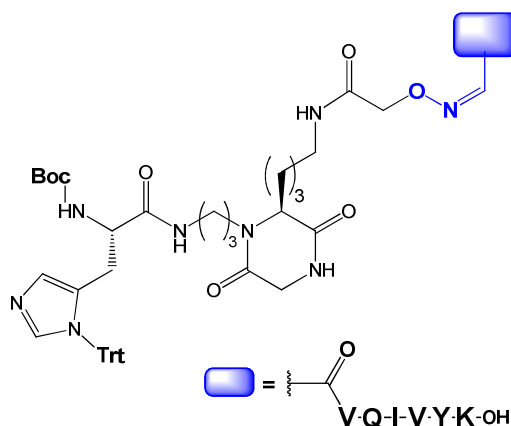
Yield: 28%

RP-HPLC: RT=10.3 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₉H₈₇N₁₅O₁₃ M_{calcd}=1214.44 g.mol⁻¹ M_{exp}=1214.8 g.mol⁻¹

D3C-His/VQIVYK 90

The protocol G was applied to diketopiperazine **88** (3 mg, 3.5 μmol) and peptide **41** (3.6 mg, 3.8 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). After 1 h the mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-60% B in 30 min). The product **90** (1 mg, 0.6 μmol) was obtained after lyophilization.



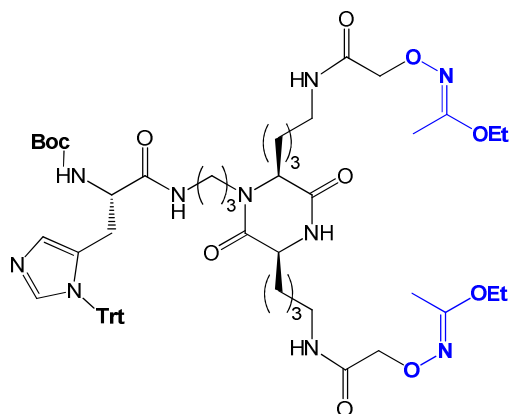
Yield: 17%

RP-HPLC: RT=8.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₅₇H₉₀N₁₆O₁₅ M_{calcd}=1239.45 g.mol⁻¹ M_{exp}=1239.8 g.mol⁻¹

D3C-(Boc)His(Trt)/2Acm 91

The crude material **80** (≈ 0.085 mmol) was dissolved in DMF (0.07 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. NHS-Aoa-Acm **43** (49 mg, 0.19 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The solution was dissolved in ethylacetate and washed once with water and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was purified by column chromatography (2-10% MeOH in DCM) to provide product **91** (36 mg, 0.033 mmol).



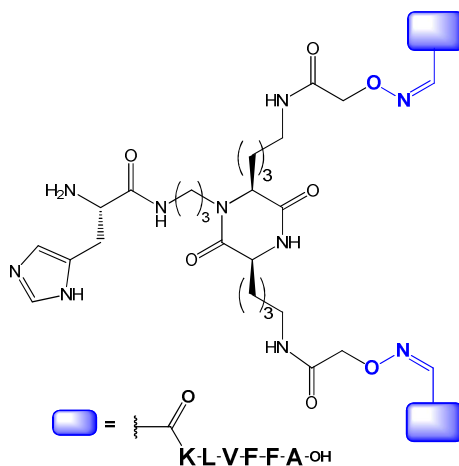
Yield: 39% (4 steps)

RP-HPLC: RT=15.8 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{57}\text{H}_{78}\text{N}_{10}\text{O}_{11}$ $M_{\text{calcd}}=1079.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=1079.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D3C-His/2KLVFFA 92

The protocol G was applied to diketopiperazine **91** (5.1 mg, 4.7 μmol) and peptide **38** (10.3 mg, 11.3 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min). The mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min). The product **92** (6.3 mg, 2.4 μmol) was obtained after lyophilization.



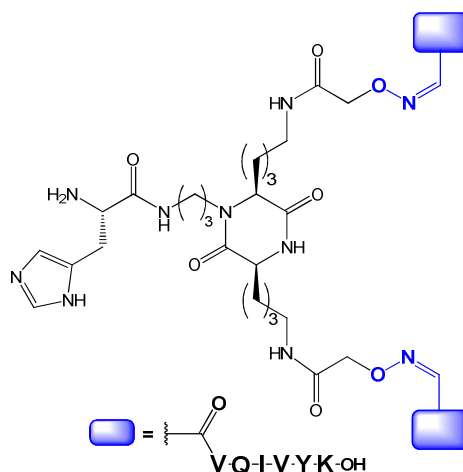
Yield: 51%

RP-HPLC: RT=13.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{105}\text{H}_{154}\text{N}_{24}\text{O}_{23}$ $M_{\text{calcd}}=2120.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=2121.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D6C-His/2VQIVYK **93**

The protocol G was applied with diketopiperazine **91** (5.6 mg, 4.6 μmol) and peptide **41** (10 mg, 11.1 μmol). The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-80% B in 20 min). After 1 h the mixture was injected by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-80% B in 30 min). The product **93** (4.4 mg, 1.7 μmol) was obtained after lyophilization.



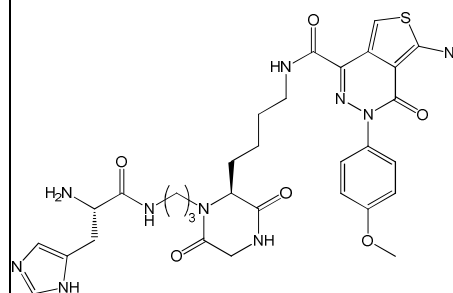
Yield: 37%

RP-HPLC: RT=8.15 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{101}\text{H}_{160}\text{N}_{26}\text{O}_{27}$ $M_{\text{calcd}}=2170.56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=2171.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D6C-His/ATPZ **94**

Diketopiperazine **16** (10 mg, 23.5 μmol) was dissolved in a TFA/DCM (0.01 M, 4.7 mL, 1:1) solution. The solution was stirred for 1 h at room temperature and concentrated under *vacuum* to provide oil which was used without further purification. This crude material was dissolved in DCM (0.05 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. Boc-His(Trt)-OH (28 mg, 0.056 mmol) and PyBOP (29 mg, 0.056 mmol) were added. The completion of the reaction was checked by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min, RT=14 min). The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was precipitated in DCM/Et₂O. The protocol F was applied to the crude product. The residue was precipitated in DCM/Et₂O. The product was dissolved in DCM (0.01 M, 2.4 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. ATPZ (9 mg, 28.2 μmol) and PyBOP (15 mg, 28.2 μmol) were added. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a TFA/DCM/H₂O/TIS (0.01 M, 2.4 mL, 4:4:1:1) solution and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product **94** (4.4 mg, 4.9 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min).



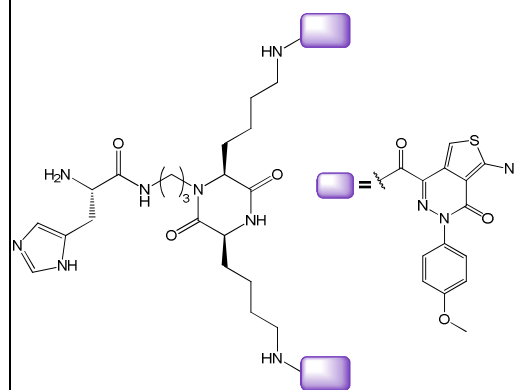
Yield: 21% (5 steps)

RP-HPLC: RT=9.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_6\text{S}$ $M_{\text{calcd}}=678.68 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=679 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

D6C-His/2ATPZ (amide) 95

Diketopiperazine **80** (9.5 mg, 12 μmol) was dissolved in DCM (0.004 M, 3 mL). ATPZ (9.5 mg, 30 μmol) and PyBOP (16 mg, 30 μmol) were added. The solution was stirred for 2 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in a TFA/DCM/H₂O/TIS (0.02 M, 2.4 mL, 4:4:1:1) solution and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvents were removed under *vacuum* and the product **95** (3.8 mg, 3 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min).



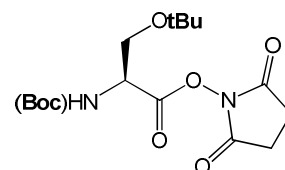
Yield: 25% (2 steps)

RP-HPLC: RT=11.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₄₉H₅₆N₁₄O₉S₂ M_{calcd}=1049.21 g.mol⁻¹ M_{exp}=1049.3 g.mol⁻¹

Boc-Ser(tBu)-N-hydroxysuccinimide ester (Boc-Ser(tBu)-NHS) 96

To a stirred solution of Boc-Ser(tBu)-OH (2.8 g, 10 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.2 g, 10.7 mmol) in ethylacetate/dioxane (1:1, 100 mL) cooled on ice bath were added DCC (2.2 g, 10.7 mmol). The mixture was stirred for 5 h at room temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite with ethylacetate and the collected filtrate was concentrated in *vacuum*. The obtained oily residue was taken into ethylacetate and washed twice with 5% aqueous NaHCO₃, and brine. The organic fraction was then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Boc-Ser(tBu)-NHS **96** (3.4 g, 9.5 mmol) was obtained after evaporation under *vacuum*.



Yield: 95%

RP-HPLC: RT=9,8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₁₆H₂₆N₂O₇ M_{calcd}=358.2 g.mol⁻¹ M_{exp}=359.3 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.41 (d, J=9.0 Hz, NH), 4.78 (d, J=9.0 Hz, H α), 3.92 (m, 1H β), 3.66 (m, 1H β), 2.82 (s, 2CH₂-NHS), 1.46 (s, 9H_{Boc}), 1.20 (s, 9H_{tBu})

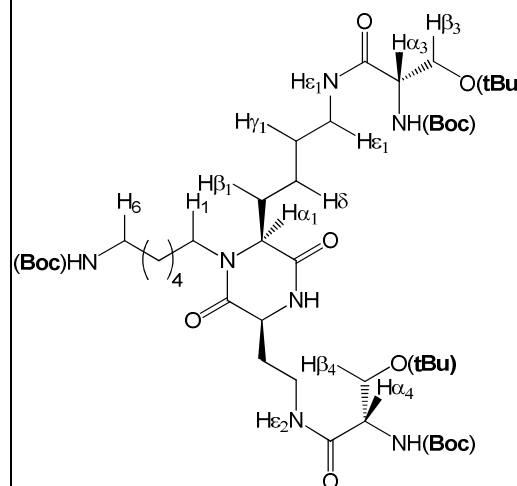
D6C-NH₂/2Ser 97

The diketopiperazine **33** (94 mg, 0.1 mmol) was dissolved in DCM (0.1 M, 1 mL) and the pH was adjusted to 9 with DIEA. Boc-Ser(tBu)-NHS **96** (79 mg, 0.22 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored by analytical RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min, RT=16.6 min). After 3 h of stirring, the mixture was diluted with AcOEt. The organic layer was washed once with 10% citric acid solution, water and brine. The organic layer was dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated on *vacuum*. The residue was purified by column chromatography (2-5% MeOH in DCM) to afford the desired product (79 mg, 0.084 mmol).

RP-HPLC: RT=16.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

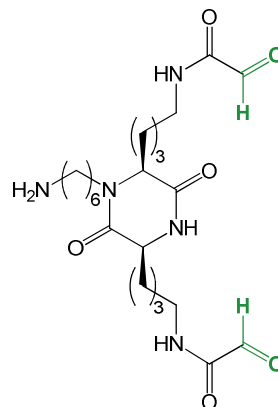
MS (ESI-MS, positive mode): C₄₇H₈₇N₇O₁₂
M_{calcd}=942.26 g.mol⁻¹ M_{exp}=942.7 g.mol⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.68 (s, 2NHε1,2), 6.36 (s, 1NH_{amide}), 5.49 (s, NHα3 or 4), 5.48 (s, NHα3 or 4), 4.60 (s, NH_{Boc}), 4.14 (s br, 2Hα3,4), 3.96–3.90 (m, 1Hα1 or 2), 3.90–3.82 (m, 1H₁+1Hα1 or 2), 3.83–3.73 (m, 1Hβ₃+1Hβ₄), 3.49–3.35 (m, 1Hβ₃+1Hβ₄), 3.34–3.21 (m, 4Hε1,2), 3.12 (s, 2H₆), 2.92–2.72 (m, 1H₁), 1.26–1.30 (m, 20H_{2-5,β,γ,δ}), 1.48 (s, 18H_{Boc}), 1.46 (s, 9H_{Boc}), 1.21 (s, 18H_{tBu})



D6C-NH₂/2CHO 98

Compound 97 (27 mg, 0.031 mmol) was dissolved in buffers A/B (0.1 M, 2.7 mL, 3:2). NaIO₄ (200 mg, 0.93 mmol) was added and the mixture was stirred for 45 min at room temperature. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-40% B in 30 min). The product 98 (8 mg, 0.013 mmol) was obtained after lyophilization.



Yield: 42%

RP-HPLC: RT=4 min (C18, 214 nm, 5-40% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode): C₂₂H₄₁N₅O₈ M_{calcd}=503.6 g.mol⁻¹ M_{exp}=504.4 g.mol⁻¹

H₂N-V-E-V-K-S-E-K-L-D-F-K-D-R-V-Q-S-K-I-G-S-K-CONH₂ 99

The peptide was assembled on rink amide resin (400 mg, 0.6 mmol/g) using the general procedure (syro II). The linear peptide was cleaved from the resin with a TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The mixture was stirred for 2 h at room temperature and the resin was washed five times with TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under *vacuum*. The residue was precipitated in DCM/Et₂O. The linear peptide was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) to afford, after lyophilization, peptide 99.

RP-HPLC: RT=8.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

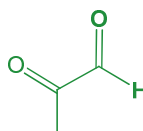
MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₀₉H₁₈₈N₃₂O₃₅

M_{calcd}=2506.91 g.mol⁻¹

M_{exp}=2507.7 g.mol⁻¹

H₂N-V-E-V-K-S-E-K-L-D-F-K-D-R-V-Q-S-K-I-G-S-K-CONH₂ 100



Peptide 99 (28 mg, 8.5 μmol) was dissolved in water (3 mM, 3 mL) and NaIO₄ (10 mg, 85 μmol) was added. The solution was injected in preparative Peptide 100 (21 mg, 6.6 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) and lyophilization.

Yield: 78%

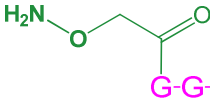
RP-HPLC: RT=10 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

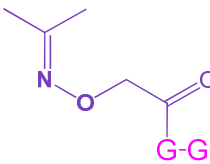
MS (ESI-MS, positive mode):

C₁₀₈H₁₈₃N₃₁O₃₅

M_{calcd}=2475.85 g.mol⁻¹

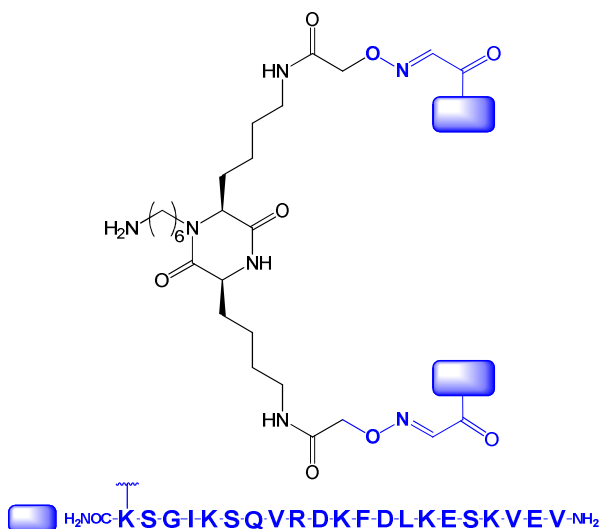
M_{exp}=2329.4 g.mol⁻¹

 <p style="text-align: center;">G-G-G-K-V-Q-I-V-Y-K-P-V-D-L-S-K-V-T-S-K-C-G-CONH₂ <u>101</u></p>	
<p>The peptide was assembled on rink amide resin (400 mg, 0.6 mmol/g) using the general procedure (syro II). The resin was solved in DMF and the pH was adjusted with DIEA. Compound 43 (76 mg, 0.264 mmol) was added and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The resin was washed four times with DMF and two times in DCM. The resin was again solved in DMF, pH was adjusted with DIEA and compound 43 (35 mg, 0.12 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The resin was washed four times with DMF and two times in DCM. The linear peptide 101 was cleaved from the resin with a TFA/TIS/H₂O/MeONH₂ (95/3/2/2) solution. The mixture was stirred for 2 h at room temperature and the resin was washed five times with TFA/DCM (1:1) solution. Cleavage and washing solutions were collected and concentrated under <i>vacuum</i>. The residue was precipitated in DCM/Et₂O. The linear peptide was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 5-100% B in 30 min) to afford after lyophilization peptide 101.</p>	<p>RP-HPLC: RT=9.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode) :</p> <p>C₁₀₂H₁₇₅N₂₉O₃₁S</p> <p>M_{calcd}=2335.77 g.mol⁻¹</p> <p>M_{exp}=2336.8 g.mol⁻¹</p>

 <p style="text-align: center;">G-G-G-K-V-Q-I-V-Y-K-P-V-D-L-S-K-V-T-S-K-C-G-CONH₂ <u>102</u></p>	
<p>Peptide 101 (5.2 mg, 1.79 μmol) was dissolved in Buffer A (4 mM, 0.5 mL). Acetone (200 μL, 2.7 μmol) was added and the reaction occurred for 2 h at 37 °C. The product 102 (1.6 mg, 0.45 μmol) was obtained after purification by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-50% B in 30 min) and lyophilization.</p>	<p>Yield: 49%</p> <p>RP-HPLC: RT=8 min (C18, 214 nm, 20-50% B in 20 min)</p> <p>MS (ESI-MS, positive mode) : C₁₀₅H₁₇₉N₂₉O₃₁S</p> <p>M_{calcd}=2375.84 g.mol⁻¹ M_{exp}=2376.4 g.mol⁻¹</p>

D6C-2R4 103

DCP **48** (0.55 mg, 0.93 μmol) was dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (2 mM, 0.5 mL, 1:1). Peptide **100** (7 mg, 2.2 μmol) was added and the reaction occurred for 2 h at 37 $^\circ\text{C}$. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-50% B in 30 min). The product **100** (3.1 mg, 0.45 μmol) was obtained after lyophilization.



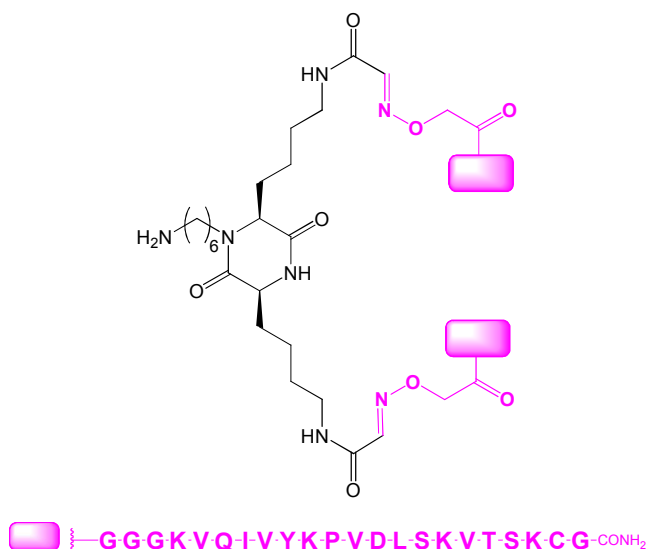
Yield: 49%

RP-HPLC: RT=8 min (C18, 214 nm, 20-50% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₂₃₈H₄₀₅N₆₉O₇₄ M_{calcd}=5417.3 g.mol⁻¹ M_{exp}=5418.8 g.mol⁻¹

D6C-2R3 104

DCP **98** (0.51 mg, 0.83 μmol) was dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (1 mM, 0.6 mL, 1:1). Peptide **101** (5.25 mg, 1.8 μmol) was added and the reaction occurred for 2 h at 37 $^\circ\text{C}$. The residue was purified by preparative RP-HPLC (C18, 214 nm, 20-50% B in 30 min). The product **104** (1.77 mg, 0.29 μmol) was obtained after lyophilization.



Yield: 35%

RP-HPLC: RT=9.7 min (C18, 214 nm, 20-50% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : C₂₂₆H₃₈₃N₆₃O₆₆S₂ M_{calcd}=5103.08 g.mol⁻¹ M_{exp}=5104.1 g.mol⁻¹

V.2. Expériences d'inhibition *in vitro*

V.2.1. Preparation of synthetic A β ₄₀ peptide

A β ₄₀ was synthesized on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer using a Fmoc-Val-Novasyn-TGA resin with a substitution level of 0.24 mmol/g. The peptide was assembled using standard solid phase methods but coupling times of 60 min were used and difficult residues were coupled twice. Deprotection and cleavage from the resin was carried out with a mixture of TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2:2:2), with swirling for 2 h. After filtration, TFA was removed under *vacuum* and the peptide was precipitated in Et₂O. A β ₄₀ peptide was obtained after purification by RP-HPLC (C5, 214 nm, 10-90% B in 30 min) and lyophilization, and was stored at -20 °C.

RP-HPLC: RT=12 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode) : $M_{\text{calcd}}=4328 \text{ g.mol}^{-1}$ $M_{\text{exp}}=4329.7 \text{ g.mol}^{-1}$

V.2.2. Preparation of inhibitor stock solutions

Inhibitors were dissolved in DMSO/H₂O (1/1). Stock solutions at 5 to 20 mM were first prepared, thereafter they were diluted with DMSO/H₂O (1/1) to the following concentrations 500 μ M to 0.5 μ M. Final concentrations of DMSO in inhibition studies were less than 2%.

V.2.3. Fibril formation measurement of A β ₄₀

A solution of A β ₄₀ was prepared as follows: 2.7 mg were dissolved in 200 μ L of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol to disassemble preformed aggregates, thereafter it was lyophilized. One mL of pure water was added to the lyophilized peptide and the solution was centrifuged at 12000 g to remove eventual aggregates. The concentration of A β ₄₀ was 500 μ M.

Aggregation of A β ₄₀ was performed in 96-well black polypropylene microplates (Sterilin). To each well an aliquot of the A β ₄₀ peptide solution was mixed into the aggregation buffer giving a final composition of A β ₄₀ (50 μ M) and ThT (10 μ M) in sodium phosphate (50 mM) and NaCl (100 mM) pH 7.4. Aliquots of 2 μ L of the inhibitor compounds were added, giving the aggregation mixture a total volume of 100 μ L. The microplates were sealed with a plastic sheet and incubated at 37 °C. The fluorescence intensity was recorded using a Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS microplate reader.

V.2.4. Atomic Force Microscopy (AFM)

Study was performed on Nanobio's "plateau caractérisation des interactions". An aliquot of 3 from each inhibition study was withdrawn at the end of the aggregation reaction and deposited onto freshly cleaved mica sheets for AFM inspection. The sample was incubated on mica for 2 minutes followed by three washes with 5 μ L water to gently remove the material not adsorbed to the substrate. The mica was air-dried for one hour. In-air AFM images were acquired in non-contact mode in a vibration insulated environment, using a PicoPlus microscope (Molecular Imaging), equipped with a PicoScan-3000 controller. For imaging, we used single beam aluminum-coated cantilevers (type NSC36/ALBS, μ masch) with $R_c < 10 \text{ nm}$, 110 - 130 μ m lengths and nominal spring constant 0.6 N/m. The drive frequency was between 200 and 400 kHz.

V.3. Caractérisation des mimes de tau

V.3.1. Circular Dichroism spectroscopy (CD)

Circular dichroism (CD) spectra were acquired with signal averaging on a Jasco J-810 Spectropolarimeter equipped with a Jasco Peltier PTC-423S temperature controller, and a baseline was recorded separately and subtracted. Far-UV spectra were recorded from 260 to 190 nm, with quartz cells and 2 s response times. Spectra are the averages of 3 scans and ellipticities are reported as mean residue ellipticities.

Compounds linR3, linR4, D6C-2R3 and D6C-2R4 were dissolved in phosphate buffer, pH 7.4, to a concentration of 25 to 100 μ M.

V.3.2. Binding of ThT: fluorescence measurements

The binding of thioflavine T (10 μ M) was recorded on a Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS50 using a 0.3 cm reduced cell with a sample volume of 70 μ L. The bandwidth was 5 nm for excitation and was 10 nm for emission, and the response time was 2 s. The fluorescence intensity and wavelength maximum shift was recorded using peptide solution with excitation at 440 nm. The emission spectra were recorded at 0.5 nm intervals between 450 and 560 nm. ThT and compounds were incubated at 37 °C in phosphate buffer, pH 7.4, before measuring the fluorescence spectrum.

V.3.3. Aggregation assays: fluorescence measurements

A. First assay

Tau models stock solutions: Compound linR3 or linR4 was dissolved in water to a concentration of 1 mM. Compounds linR3 and linR4 were dissolved together in water to a concentration of 500 μ M for each compound. Compound D6C-2R3 or D6C-2R4 was dissolved in water to a concentration of 500 μ M. Compounds D6C-2R3 and D6C-2R4 were dissolved together in water to a concentration of 250 μ M for each compound.

Aggregation of tau models was performed in 96-well black polypropylene microplates (Sterilin). For each condition, each well (final 100 μ L) was prepared as follow:

- Condition 1: 50 μ L of the aggregation buffer (final composition: 50 mM sodium phosphate and 100 mM NaCl pH 7.4), 10 μ L ThT (10 μ M final) and 30 μ L of water. 10 μ L of the tau models stock solutions solution were added.
- Condition 2: 50 μ L of the aggregation buffer (final composition: 50 mM sodium phosphate and 100 mM NaCl pH 7.4), 10 μ L ThT (10 μ M final), 28 μ L of water and 2 μ L of DTT (final 1 mM). 10 μ L of the tau models stock solutions solution were added.
- Condition 3: 50 μ L of the aggregation buffer (final composition: 50 mM sodium phosphate and 100 mM NaCl pH 7.4), 10 μ L ThT (10 μ M final), 20 μ L of water and 10 μ L of heparin solution (in water, final composition: 4:1 tau models/heparin). 10 μ L of the tau models stock solutions solution were added.
- Condition 4: 50 μ L of the aggregation buffer (final composition: 50 mM sodium phosphate and 100 mM NaCl pH 7.4), 10 μ L ThT (10 μ M final), 18 μ L of water, 10 μ L of heparin solution (in water, final composition: 4:1 tau models/heparin) and 2 μ L of DTT (final 1 mM). 10 μ L of the tau models stock solutions solution were added.

The microplate was sealed with a plastic sheet and incubated at 37 °C in an Omega series (BMG Labtech) microplate reader.

B. Second assay

Compound **linR3** or **D6C-2R3** was dissolved in PBS to a concentration of 75 µM. Inhibitors were dissolved in DMSO/H₂O (1/1) and stock solutions were prepared as described previously (see Aβ₄₀ aggregation assay).

Aggregation of tau models was performed in 96-well black polystyrene low-binding (half area) microplates (Sterilin). Each well (final 50 µL) was prepared as follow: 20 µL of tau model stock solution (final 30 µM), 6 µL of PBS buffer, 10 µL of ThS (in PBS, final 30µM), heparin (in PBS, final composition 4:1 tau model/heparin) and 2 µL DTT (in PBS, final 2 mM). 2 µL of inhibitor stock solution or H₂O/DMSO (1:1) solution was added.

The microplate was sealed with a plastic sheet and incubated at 37 °C in an Omega series (BMG Labtech) microplate reader.

V.3.4. Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM was performed as described previously (Aβ₄₀ aggregation).

VI. Bibliographie

- 1.(a) Grateau, G.; Verine, J.; Delpech, M.; Ries, M., Les amyloses, un modèle de maladie du repliement des protéines. *Med. Sci. (Paris)* **2005**, *21* (6-7), 627-633; (b) Buxbaum, J. N.; Linke, R. P., A Molecular History of the Amyloidoses. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421* (2-3), 142-159.
- 2.(a) Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.-i.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermark, P., Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* **2012**, *19* (4), 167-170; (b) Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem* **2006**, *75* (1), 333-366.
- 3.(a) Puchtler, H.; Sweat, F.; Levine, M., On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **1962**, *10* (3), 355-364; (b) Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P., [19] Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 285-305.
- 4.(a) Levine, H., Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, *2* (3), 404-410; (b) LeVine Iii, H., [18] Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274-284.
- 5.(a) Cohen, A. S.; Calkins, E., Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* **1959**, *183* (4669), 1202-1203; (b) Shirahama, T.; Cohen, A. S., High-Resolution Electron Microscopic Analysis of the Amyloid Fibril. *J. Cell Biol* **1967**, *33* (3), 679-708.
- 6.(a) Sunde, M.; Blake, C., The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. In *Adv. Protein Chem.*, Frederic M. Richards, D. S. E.; Peter, S. K., Eds. Academic Press: 1997; Vol. Volume 50, pp 123-159; (b) Makin, O. S.; Serpell, L. C., Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **2005**, *272* (23), 5950-5961.
- 7.Eanes, E. D.; Glenner, G. G., X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, *16* (11), 673-677.
- 8.Alzheimer, A., Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschribe Psychiatrie* **1907**, *64*, 146-148.
- 9.Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H., Alzheimer's disease. *Lancet* **2006**, *368* (9533), 387-403.
- 10.Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120* (3), 885-890.
- 11.Hardy, J.; Selkoe, D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297* (5580), 353-356.
- 12.(a) Kosik, K. S.; Joachim, C. L.; Selkoe, D. J., Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83* (11), 4044-4048; (b) Nukina, N.; Ihara, Y., One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J. Biochem.* **1986**, *99* (5), 1541-1544.
- 13.Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H., Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (17), 3030-3059.
- 14.Mucke, L., Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature.* **2009**, *461* (7266), 895-897.
- 15.Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.;

Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J.-C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M., β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* **1999**, *286* (5440), 735-741.

16.Jarrett, J. T.; Lansbury Jr, P. T., "Seeding" one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **1993**, *73* (6), 1055.

17.Lomakin, A.; Chung, D. S.; Benedek, G. B.; Kirschner, D. A.; Teplow, D. B., On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (3), 1125-1129.

18.Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z.; Yau, W.-M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's β -Amyloid Fibrils. *Science* **2005**, *307* (5707), 262-265.

19.Haass, C.; Selkoe, D. J., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (2), 101-112.

20.Harper, J. D.; Lansbury Jr, P. T., Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem* **1997**, *66* (1), 385-407.

21.(a) Harper, J. D.; Lieber, C. M.; Lansbury, P. T., Jr., Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid- β protein. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (12), 951-9; (b) Harper, J. D.; Wong, S. S.; Lieber, C. M.; Lansbury, P. T., Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (2), 119-125.

22.(a) Walsh, D. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B., Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (35), 22364-22372; (b) Walsh, D. M.; Hartley, D. M.; Kusumoto, Y.; Fezoui, Y.; Condron, M. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B., Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (36), 25945-25952.

23.Bitán, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B.; Teplow, D. B., Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (1), 330-335.

24.Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K. L.; Lacor, P. N.; Lambert, M. P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L., Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (18), 10417-10422.

25.Bernstein, S. L.; Dupuis, N. F.; Lazo, N. D.; Wyttenbach, T.; Condron, M. M.; Bitán, G.; Teplow, D. B.; Shea, J.-E.; Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V.; Bowers, M. T., Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* **2009**, *1* (4), 326-331.

26.Lesn , S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Yang, A.; Gallagher, M.; Ashe, K. H., A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **2006**, *440* (7082), 352-357.

27.Gorevic, P.; Castano, E.; Sarma, R.; Frangione, B., Ten to fourteen residue peptides of Alzheimer's disease protein are sufficient for amyloid fibril formation and its characteristic X-ray diffraction pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *147* (2), 854-862.

28.Pike, C. J.; Overman, M. J.; Cotman, C. W., Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (41), 23895-23898.

29.(a) Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlstr m, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Arrest of β -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand. *J. Biol.*

- Chem.* **1996**, 271 (15), 8545-8548; (b) Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Controlling Amyloid β -Peptide Fibril Formation with Protease-stable Ligands. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (19), 12601-12605.
30. Tjernberg, L. O.; Callaway, D. J. E.; Tjernberg, A.; Hahne, S.; Lilliehöök, C.; Terenius, L.; Thyberg, J.; Nordstedt, C., A molecular model of Alzheimer amyloid β -peptide fibril formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (18), 12619-12625.
- 31.(a) Yankner, B. A.; Duffy, L. K.; Kirschner, D. A., Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science (New York, NY)* **1990**, 250 (4978), 279; (b) Pike, C. J.; Walencewicz-Wasserman, A. J.; Kosmoski, J.; Cribbs, D. H.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W., Structure-Activity Analyses of β -Amyloid Peptides: Contributions of the β 25–35 Region to Aggregation and Neurotoxicity. *J. Neurochem.* **1995**, 64 (1), 253-265.
32. Wood, S. J.; Wetzel, R.; Martin, J. D.; Hurle, M. R., Prolines and Amyloidogenicity in Fragments of the Alzheimer's Peptide β /A4. *Biochemistry* **1995**, 34 (3), 724-730.
33. Terzi, E.; Hoelzemann, G.; Seelig, J., Reversible Random Coil- β -Sheet Transition of the Alzheimer .beta.-Amyloid Fragment (25-35). *Biochemistry* **1994**, 33 (6), 1345-1350.
34. Williams, A. D.; Portelius, E.; Kheterpal, I.; Guo, J.; Cook, K. D.; Xu, Y.; Wetzel, R., Mapping A β amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **2004**, 335 (3), 833-842.
35. Shivaprasad, S.; Wetzel, R., An intersheet packing interaction in A β fibrils mapped by disulfide cross-linking. *Biochemistry* **2004**, 43 (49), 15310-15317.
36. Shivaprasad, S.; Wetzel, R., Scanning Cysteine Mutagenesis Analysis of A β -(1-40) Amyloid Fibrils. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (2), 993-1000.
37. Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R., A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (26), 16742-16747.
38. Petkova, A. T.; Yau, W. M.; Tycko, R., Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Biochemistry* **2006**, 45 (2), 498-512.
39. Paravastu, A. K.; Leapman, R. D.; Yau, W.-M.; Tycko, R., Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (47), 18349-18354.
40. Tycko, R.; Wickner, R. B., Molecular Structures of Amyloid and Prion Fibrils: Consensus versus Controversy. *Acc. Chem. Res.* **2013**.
41. Sachse, C.; Fändrich, M.; Grigorieff, N., Paired β -sheet structure of an A β (1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (21), 7462-7466.
42. Gustke, N.; Trinczek, B.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* **1994**, 33 (32), 9511-9522.
- 43.(a) Buée, L.; Bussi re, T.; Bu e-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **2000**, 33 (1), 95-130; (b) Bu e, L.; Delacourte, A., Tauopathie et maladie d'Alzheimer, un processus d g n ratif   part entière. *Psychol Neuropsychia* **2006**, 4 (4), 261-273.
44. Kolarova, M.; García-Sierra, F.; Bartos, A.; Ricny, J.; Ripova, D., Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 2012.
45. Mandelkow, E.; Von Bergen, M.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M., Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* **2007**, 17 (1), 83-90.

46. Braak, H.; Braak, E., Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl)*. **1991**, 82 (4), 239-259.
47. Goedert, M.; Spillantini, M.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R., Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **1989**, 3 (4), 519-526.
48. Friedhoff, P.; Schneider, A.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* **1998**, 37 (28), 10223-10230.
49. Gamblin, T. C.; Berry, R. W.; Binder, L. I., Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis. *Biochemistry* **2003**, 42 (51), 15009-15017.
50. Berriman, J.; Serpell, L. C.; Oberg, K. A.; Fink, A. L.; Goedert, M.; Crowther, R. A., Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross- β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (15), 9034-9038.
51. Carlson, S. W.; Branden, M.; Voss, K.; Sun, Q.; Rankin, C. A.; Gamblin, T. C., A complex mechanism for inducer mediated tau polymerization. *Biochemistry* **2007**, 46 (30), 8838-8849.
52. Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M.; Hasegawa, M.; Smith, M.; Crowther, R., Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **1996**, 383 (6600), 550-553.
53. Wilson, D. M.; Binder, L. I., Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid β peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **1997**, 150 (6), 2181.
54. Chirita, C. N.; Necula, M.; Kuret, J., Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (28), 25644-25650.
55. Gamblin, T. C.; King, M. E.; Kuret, J.; Berry, R. W.; Binder, L. I., Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* **2000**, 39 (46), 14203-14210.
56. Barghorn, S.; Mandelkow, E., Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **2002**, 41 (50), 14885-14896.
57. Xu, S.; Brunden, K. R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.-Y., Characterization of tau fibrillization in vitro. *Alzheimers Dement* **2010**, 6 (2), 110-117.
58. Wegmann, S.; Jung, Y. J.; Chinnathambi, S.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Muller, D. J., Human tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (35), 27302-27313.
59. Friedhoff, P.; Von Bergen, M.; Mandelkow, E.-M.; Davies, P.; Mandelkow, E., A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95 (26), 15712-15717.
60. Kuret, J.; Chirita, C. N.; Congdon, E. E.; Kannanayakal, T.; Li, G.; Necula, M.; Yin, H.; Zhong, Q., Pathways of tau fibrillization. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739 (2-3), 167-178.
61. Congdon, E. E.; Kim, S.; Bonchak, J.; Songrug, T.; Matzavinos, A.; Kuret, J., Nucleation-dependent Tau Filament Formation: The importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (20), 13806-13816.
62. Peterson, D. W.; Zhou, H.; Dahlquist, F. W.; Lew, J., A soluble oligomer of tau associated with fiber formation analyzed by NMR. *Biochemistry* **2008**, 47 (28), 7393-7404.
63. Chirita, C. N.; Kuret, J., Evidence for an Intermediate in Tau Filament Formation[†]. *Biochemistry* **2004**, 43 (6), 1704-1714.

64. Maeda, S.; Sahara, N.; Saito, Y.; Murayama, M.; Yoshiike, Y.; Kim, H.; Miyasaka, T.; Murayama, S.; Ikai, A.; Takashima, A., Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments[†]. *Biochemistry* **2007**, *46* (12), 3856-3861.
65. von Bergen, M.; Barghorn, S.; Müller, S. A.; Pickhardt, M.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Davies, P.; Aebi, U.; Mandelkow, E., The Core of Tau-Paired Helical Filaments Studied by Scanning Transmission Electron Microscopy and Limited Proteolysis[†]. *Biochemistry* **2006**, *45* (20), 6446-6457.
66. Barghorn, S.; Davies, P.; Mandelkow, E., Tau Paired Helical Filaments from Alzheimer's Disease Brain and Assembled in Vitro Are Based on β -Structure in the Core Domain[†]. *Biochemistry* **2004**, *43* (6), 1694-1703.
67. Von Bergen, M.; Friedhoff, P.; Biernat, J.; Heberle, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (10), 5129-5134.
68. Li, W.; Virginia, M.-Y. L., Characterization of two VQIXXK motifs for tau fibrillization in vitro. *Biochemistry* **2006**, *45* (51), 15692-15701.
69. Perez, M.; Santa-María, I.; Tortosa, E.; Cuadros, R.; Valle, M. d.; Hernández, F.; Moreno, F. J.; Avila, J., The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation. *J. Neurochem.* **2007**, *103* (4), 1447-1460.
70. Jeganathan, S.; von Bergen, M.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments[†]. *Biochemistry* **2008**, *47* (40), 10526-10539.
71. Fischer, D.; Mukrasch, M. D.; von Bergen, M.; Klos-Witkowska, A.; Biernat, J.; Griesinger, C.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M., Structural and Microtubule Binding Properties of Tau Mutants of Frontotemporal Dementias[†]. *Biochemistry* **2007**, *46* (10), 2574-2582.
72. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E.-M.; Waldmann, H.; Mandelkow, E., Development of Tau Aggregation Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (10), 1740-1752.
73. Binder, L. I.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Garcia-Sierra, F.; Berry, R. W., Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **2005**, *1739* (2), 216-223.
74. Abraha, A.; Ghoshal, N.; Gamblin, T. C.; Cryns, V.; Berry, R. W.; Kuret, J.; Binder, L. I., C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* **2000**, *113* (21), 3737-3745.
75. Berry, R.; Abraha, A.; Lagalwar, S.; LaPointe, N.; Gamblin, T.; Cryns, V.; Binder, L., Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* **2003**, *42* (27), 8325-8331.
76. Horowitz, P. M.; LaPointe, N.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Berry, R. W.; Binder, L. I., N-terminal fragments of tau inhibit full-length tau polymerization in vitro. *Biochemistry* **2006**, *45* (42), 12859-12866.
77. LaPointe, N. E.; Horowitz, P. M.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Silva, A.; Andreadis, A.; Binder, L. I., Tau 6D and 6P isoforms inhibit polymerization of full-length tau in vitro. *Biochemistry* **2009**, *48* (51), 12290-12297.
78. Ballatore, C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q., Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8* (9), 663-672.

79. Ittner, L. M.; Götz, J., Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2010**, *12* (2), 67-72.
80. Hardy, J. A.; Higgins, G. A., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**.
81. Selkoe, D. J., The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **1991**, *6* (4), 487.
82. Fändrich, M., Oligomeric intermediates in amyloid formation: Structure determination and mechanisms of toxicity. *J. Mol. Biol.* **2012**.
83. Tsai, J.; Grutzendler, J.; Duff, K.; Gan, W.-B., Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7* (11), 1181-1183.
84. Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B., The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15* (3), 349-357.
85. Hartley, D. M.; Walsh, D. M.; Ye, C. P.; Diehl, T.; Vasquez, S.; Vassilev, P. M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J., Protofibrillar Intermediates of Amyloid β -Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons. *J. Neurosci.* **1999**, *19* (20), 8876-8884.
86. Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A., Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **2008**, *14* (8), 837-842.
87. Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J., Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **2002**, *416* (6880), 535-539.
88. Hémar, A.; Mulle, C., Maladie d'Alzheimer, peptide β -amyloïde et synapses Alzheimer's disease, amyloid peptide and synaptic dysfunction. *Med Sci (Paris)* **2011**, *27*, 733-736.
89. Pham, E.; Crews, L.; Ubhi, K.; Hansen, L.; Adame, A.; Cartier, A.; Salmon, D.; Galasko, D.; Michael, S.; Savas, J. N., Progressive accumulation of amyloid- β oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* **2010**, *277* (14), 3051-3067.
90. Baker, H.; Ridley, R.; Duchon, L.; Crow, T.; Bruton, C., Induction of β (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. *Mol. Neurobiol.* **1994**, *8* (1), 25-39.
91. Jin, M.; Shepardson, N.; Yang, T.; Chen, G.; Walsh, D.; Selkoe, D. J., Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (14), 5819-5824.
92. Meraz-Ríos, M. A.; Lira-De León, K. I.; Campos-Peña, V.; De Anda-Hernández, M. A.; Mena-López, R., Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *112* (6), 1353-1367.
93. Santacruz, K.; Lewis, J.; Spies, T.; Paulson, J.; Kotilinek, L.; Ingelsson, M.; Guimaraes, A.; DeTure, M.; Ramsden, M.; McGowan, E., Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **2005**, *309* (5733), 476-481.
94. Le Corre, S.; Klafki, H. W.; Plesnila, N.; Hübinger, G.; Obermeier, A.; Sahagún, H.; Monse, B.; Seneci, P.; Lewis, J.; Eriksen, J., An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (25), 9673-9678.
95. Maeda, S.; Sahara, N.; Saito, Y.; Murayama, S.; Ikai, A.; Takashima, A., Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.* **2006**, *54* (3), 197-201.

- 96.Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Sengupta, U.; Sarmiento, J.; Troncoso, J.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2012**, *26* (5), 1946-1959.
- 97.Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Sengupta, U.; Guerrero-Munoz, M. J.; Kiritoshi, T.; Neugebauer, V.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci. Rep.* **2012**, *2*.
- 98.Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Guerrero-Munoz, M. J.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Preparation and Characterization of Neurotoxic Tau Oligomers. *Biochemistry* **2010**, *49* (47), 10039-10041.
- 99.Berger, Z.; Roder, H.; Hanna, A.; Carlson, A.; Rangachari, V.; Yue, M.; Wszolek, Z.; Ashe, K.; Knight, J.; Dickson, D., Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.* **2007**, *27* (14), 3650-3662.
- 100.Oddo, S.; Billings, L.; Kesslak, J. P.; Cribbs, D. H.; LaFerla, F. M., A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **2004**, *43* (3), 321-32.
- 101.Roberson, E. D.; Scarce-Levie, K.; Palop, J. J.; Yan, F.; Cheng, I. H.; Wu, T.; Gerstein, H.; Yu, G.-Q.; Mucke, L., Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Sci Signal* **2007**, *316* (5825), 750.
- 102.Ittner, L. M.; Ke, Y. D.; Delerue, F.; Bi, M.; Gladbach, A.; van Eersel, J.; Wölfling, H.; Chieng, B. C.; Christie, M. J.; Napier, I. A., Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **2010**, *142* (3), 387-397.
- 103.Rhein, V.; Song, X.; Wiesner, A.; Ittner, L. M.; Baysang, G.; Meier, F.; Ozmen, L.; Bluethmann, H.; Dröse, S.; Brandt, U., Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (47), 20057-20062.
- 104.Gosselet, F.; Candela, P.; Cecchelli, R.; Fenart, L., La barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)* **2011**, *27* (11), 987.
- 105.(a) Banks, W. A., Drug transport into the central nervous system: using newer findings about the blood-brain barriers. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2012**, *2* (3), 152-159; (b) Banks, W. A., Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood-brain barrier. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, *64* (7), 629-639.
- 106.Chen, Y.; Liu, L., Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, *64* (7), 640-665.
- 107.Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G., Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 195-206.
- 108.Foucoute, L.; Gourand, F.; Dhilly, M.; Bohn, P.; Dupas, G.; Costentin, J.; Abbas, A.; Marsais, F.; Barré, L.; Levacher, V., Synthesis, radiosynthesis and biological evaluation of 1, 4-dihydroquinoline derivatives as new carriers for specific brain delivery. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (18), 3666-3673.
- 109.Gourand, F.; Mercey, G.; Ibazène, M. z.; Tirel, O.; Henry, J.; Levacher, V.; Perrio, C.; Barré, L., Chemical delivery system of metaiodobenzylguanidine (MIBG) to the central nervous system. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (3), 1281-1287.
- 110.Kreuter, J., Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**.
- 111.Liu, Z.; Gao, X.; Kang, T.; Jiang, M.; Miao, D.; Gu, G.; Hu, Q.; Song, Q.; Yao, L.; Tu, Y., B6 peptide-modified PEG-PLA nanoparticles for enhanced brain delivery of neuroprotective peptide. *Bioconjugate Chem.* **2013**.

112. Rigaud, A.-S.; Forette, F., Maladie d'Alzheimer: vision d'ensemble, aspects cliniques, facteurs de risque et prévention Alzheimer's disease: overview, risk factors and prévention. *Med Sci (Paris)* **2002**, *18*, 689-696.
113. Knopman, D.; DeKosky, S. T.; Cummings, J.; Chui, H.; Corey-Bloom, J.; Relkin, N.; Small, G.; Miller, B.; Stevens, J., Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review) Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2001**, *56* (9), 1143-1153.
114. Dubois, B.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; Cummings, J. L.; DeKosky, S. T.; Barberger-Gateau, P.; Delacourte, A.; Frisoni, G.; Fox, N. C.; Galasko, D., Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* **2010**, *9* (11), 1118-1127.
115. (a) Craig-Schapiro, R.; Fagan, A. M.; Holtzman, D. M., Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *35* (2), 128-140; (b) Blennow, K.; Zetterberg, H.; Fagan, A. M., Fluid Biomarkers in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2* (9).
116. Hansson, O.; Zetterberg, H.; Buchhave, P.; Londos, E.; Blennow, K.; Minthon, L., Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* **2006**, *5* (3), 228-234.
117. (a) Ewers, M.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E.; Weiner, M. W.; Hampel, H., Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia. *Trends Neurosci.* **2011**, *34* (8), 430-442; (b) Johnson, K. A.; Fox, N. C.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E., Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2* (4).
118. Chételat, G., La neuro-imagerie au service de la maladie d'Alzheimer. *Med Sci (Paris)* **2011**, *27*, 193-198.
119. Dougall, N. J.; Bruggink, S.; Ebmeier, K. P., Systematic review of the diagnostic accuracy of ^{99m}Tc-HMPAO-SPECT in dementia. *American Journal of Geriatric Psych* **2004**, *12* (6), 554-570.
120. Small, G., What does imaging add to the management of Alzheimer's disease? *CNS spectrums* **2004**, *9* (7 Suppl 5), 20.
121. Hong-Qi, Y.; Zhi-Kun, S.; Sheng-Di, C., Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A β and tau. *Transl Neurodegener* **2012**, *1* (1), 1-12.
122. Aisen, P. S.; Cummings, J.; Schneider, L. S., Symptomatic and Nonamyloid/Tau Based Pharmacologic Treatment for Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2* (3).
123. Citron, M., Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (5), 387-398.
124. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M., Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet neurology* **2010**, *9* (7), 702.
125. Himmelstein, D. S.; Ward, S. M.; Lancia, J. K.; Patterson, K. R.; Binder, L. I., Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacol. Ther.* **2012**.
126. Oz, M.; Lorke, D. E.; Petroianu, G. A., Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78* (8), 927-932.
127. Lobello, K.; Ryan, J. M.; Liu, E.; Rippon, G.; Black, R., Targeting Beta Amyloid: A Clinical Review of Immunotherapeutic Approaches in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, *2012*.
128. (a) Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of Amyloid β -Peptide Protofibril Formation by a Designed Template Assembly. *Angew. Chem.* **2006**, *118* (17), 2765-2768; (b) Ouberaï, M.; Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Amyloidogenesis highlighted by designed peptides forming supramolecular self-assemblies. *Chem Sci* **2011**, *2* (7), 1293-1300.

129. Dolphin, G. T.; Ouberaï, M.; Dumy, P.; Garcia, J., Designed Amyloid β Peptide Fibril—A Tool for High-Throughput Screening of Fibril Inhibitors. *ChemMedChem* **2007**, 2 (11), 1613-1623.
130. Ouberaï, M. Conception de modèles de fibres amyloïdes et d'inhibiteurs de la fibrillogénèse. Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2008.
131. Dolphin, G. T.; Chierici, S.; Ouberaï, M.; Dumy, P.; Garcia, J., A Multimeric Quinacrine Conjugate as a Potential Inhibitor of Alzheimer's β -Amyloid Fibril Formation. *ChemBioChem* **2008**, 9 (6), 952-963.
132. Ouberaï, M.; Dumy, P.; Chierici, S.; Garcia, J., Synthesis and Biological Evaluation of Clicked Curcumin and Clicked KLVFFA Conjugates as Inhibitors of β -Amyloid Fibril Formation. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20 (11), 2123-2132.
133. Ouberaï, M.; Brannstrom, K.; Vestling, M.; Olofsson, A.; Dumy, P.; Chierici, S.; Garcia, J., Clicked tacrine conjugates as acetylcholinesterase and β -amyloid directed compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (4), 1140-1147.
134. (a) Mutter, M.; Altmann, K. H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S., Strategies for the de novo design of proteins. *Tetrahedron* **1988**, 44 (3), 771-785; (b) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical method for new proteins. Template-associated synthetic proteins (TASP). *Angew. Chem., Int. Ed* **1989**, 28, 1535-1554; (c) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35 (13-14), 1482-1485.
135. (a) Dumy, P.; Eggleston, I.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. In *Conformational Studies of RAFT Molecules for Protein Design*, Peptides-American-Symposium-, Escom Science Publishers: **1996**; pp 605-608; (b) Peluso, S.; Rückle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M., Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. *ChemBioChem* **2001**, 2 (6), 432-437.
136. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M., A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (8), 1255-1258.
137. Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P., RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *J. Pept. Sci.* **2008**, 14 (2), 224-240.
138. (a) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (14), 2576-2579; (b) Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D., Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew. Chem.* **2011**, 123 (8), 1941-1944.
139. Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbé, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, 9 (16), 2588-2591.
140. Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Defrancq, E., Click-click chemistry on a peptidic scaffold for easy access to tetrameric DNA structures. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (48), 5992-5994.
141. Bossu, I.; Sulc, M.; Krennek, K.; Dufour, E.; Garcia, J.; Berthet, N.; Dumy, P.; Kren, V.; Renaudet, O., Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (6), 1948-1959.
142. Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P., Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16 (5), 1149-1159.

143. Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P., Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5730-5739.
144. Teixidó, M.; Zurita, E.; Malakoutikhah, M.; Tarragó, T.; Giralt, E., Diketopiperazines as a Tool for the Study of Transport across the Blood–Brain Barrier (BBB) and Their Potential Use as BBB-Shuttles. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (38), 11802-11813.
145. Borthwick, A. D., 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (7), 3641-3716.
146. Ressurreição, A. S. M.; Delatouche, R.; Gennari, C.; Piarulli, U., Bifunctional 2,5-Diketopiperazines as Rigid Three-Dimensional Scaffolds in Receptors and Peptidomimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011* (2), 217-228.
147. Martins, M. B.; Carvalho, I., Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron* **2007**, *63* (40), 9923-9932.
148. Cornacchia, C.; Cacciatore, I.; Baldassarre, L.; Mollica, A.; Feliciani, F.; Pinnen, F., 2,5-Diketopiperazines as neuroprotective agents. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12* (1), 2.
149. (a) Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Shao, X.; Chen, J. J.; Colson, A.-O.; Grieb, A. L.; Russell, A. F., Solid-Supported Synthesis of a Peptide β -Turn Mimetic. *Org. Lett.* **2000**, *2* (17), 2615-2617; (b) Golebiowski, A.; Klopfenstein, S. R.; Chen, J. J.; Shao, X., Solid supported high-throughput organic synthesis of peptide β -turn mimetics via tandem Petasis reaction/diketopiperazine formation. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (25), 4841-4844; (c) Golebiowski, A.; Jozwik, J.; Klopfenstein, S. R.; Colson, A.-O.; Grieb, A. L.; Russell, A. F.; Rastogi, V. L.; Diven, C. F.; Portlock, D. E.; Chen, J. J., Solid-supported synthesis of putative peptide β -turn mimetics via Ugi reaction for diketopiperazine formation. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4* (6), 584-590.
150. Kim, H.-O.; Nakanishi, H.; Lee, M. S.; Kahn, M., Design and synthesis of novel conformationally restricted peptide secondary structure mimetics. *Org. Lett.* **2000**, *2* (3), 301-302.
151. Ressurreição, A. S. M.; Bordessa, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Gennari, C.; Piarulli, U., Synthesis and conformational studies of peptidomimetics containing a new bifunctional diketopiperazine scaffold acting as a β -hairpin inducer. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (2), 652-660.
152. Delatouche, R.; Durini, M.; Civera, M.; Belvisi, L.; Piarulli, U., Foldamers of bifunctional diketopiperazines displaying a β -bend ribbon structure. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (32), 4278-4280.
153. (a) Beeli, R.; Steger, M.; Linden, A.; Robinson, J. A., A Tricyclic Template Derived from (2S, 4R)-4-Hydroxyproline for the Synthesis of Protein Loop Mimetics. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79* (8), 2235-2248; (b) Pfeifer, M. E.; Linden, A.; Robinson, J. A., Synthesis of a Novel Tricyclic Dipeptide Template and Its Incorporation into a Cyclic Peptide Mimetic Containing an NPNA Motif. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80* (5), 1513-1527; (c) Pfeifer, M. E.; Robinson, J. A., Stabilisation of β -hairpin conformations in a protein surface mimetic using a bicyclic template derived from (2S, 3R, 4R)-diaminoproline. *Chem. Commun.* **1998**, (18), 1977-1978; (d) Pfeifer, M. E.; Moehle, K.; Linden, A.; Robinson, J. A., Synthesis and Solution Conformation of β -Hairpin Mimetics Utilizing a Template Derived from (2S, 3R, 4R)-Diaminoproline. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83* (2), 444-464.
154. Emery, F.; Bisang, C.; Favre, M.; Jiang, L.; Robinson, J. A., A template for the solid-phase synthesis of conformationally restricted protein loop mimetics. *Chem. Commun.* **1996**, (18), 2155-2156.
155. Royo, M.; Van Den Nest, W.; del Fresno, M.; Frieden, A.; Yahalom, D.; Rosenblatt, M.; Chorev, M.; Albericio, F., Solid-phase syntheses of constrained RGD scaffolds and their binding to the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (42), 7387-7391.

- 156.da Ressurreição, A. S. M.; Vidu, A.; Civera, M.; Belvisi, L.; Potenza, D.; Manzoni, L.; Ongeri, S.; Gennari, C.; Piarulli, U., Cyclic RGD-Peptidomimetics Containing Bifunctional Diketopiperazine Scaffolds as New Potent Integrin Ligands. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (45), 12184-12188.
- 157.(a) Wennemers, H.; Conza, M.; Nold, M.; Krattiger, P., Diketopiperazine receptors: a novel class of highly selective receptors for binding small peptides. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* (15), 3342-3347; (b) Conza, M.; Wennemers, H., Selective binding of two-armed diketopiperazine receptors to side-chain-protected peptides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (8), 2696-2698.
- 158.Wennemers, H.; Nold, M. C.; Conza, M. M.; Kulicke, K. J.; Neuburger, M., Flexible but with a Defined Turn—Influence of the Template on the Binding Properties of Two-Armed Receptors. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (2), 442-448.
- 159.Carolan, J. V.; Butler, S. J.; Jolliffe, K. A., Selective anion binding in water with use of a zinc (II) dipicolylamino functionalized diketopiperazine scaffold. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (8), 2992-2996.
- 160.Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B., Inhibition of Alzheimer's Amyloidosis by Peptides That Prevent β -Sheet Conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *226* (3), 672-680.
- 161.Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Asok Kumar, R.; Castano, E. M.; Frangione, B., β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* **1998**, *4* (7), 822-826.
- 162.Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Kumar, A.; Frangione, B.; Soto, C., β -sheet breaker peptide inhibitor of Alzheimer's amyloidogenesis with increased blood–brain barrier permeability and resistance to proteolytic degradation in plasma. *J. Neurobiol.* **1999**, *39* (3), 371-382.
- 163.Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie, L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boulé, M.; Sarazin, P.; Stéa, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F., Stereoselective Interactions of Peptide Inhibitors with the β -Amyloid Peptide. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (37), 34874-34881.
- 164.Austen, B. M.; Paleologou, K. E.; Ali, S. A. E.; Qureshi, M. M.; Allsop, D.; El-Agnaf, O. M. A., Designing Peptide Inhibitors for Oligomerization and Toxicity of Alzheimer's β -Amyloid Peptide†. *Biochemistry* **2008**, *47* (7), 1984-1992.
- 165.Matharu, B.; El-Agnaf, O.; Razvi, A.; Austen, B. M., Development of retro-inverso peptides as anti-aggregation drugs for β -amyloid in Alzheimer's disease. *Peptides* **2010**, *31* (10), 1866-1872.
- 166.Taylor, M.; Moore, S.; Mayes, J.; Parkin, E.; Beeg, M.; Canovi, M.; Gobbi, M.; Mann, D. M. A.; Allsop, D., Development of a Proteolytically Stable Retro-Inverso Peptide Inhibitor of β -Amyloid Oligomerization as a Potential Novel Treatment for Alzheimer's Disease. *Biochemistry* **2010**, *49* (15), 3261-3272.
- 167.Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J., Inhibition of Toxicity in the β -Amyloid Peptide Fragment β -(25–35) Using N-Methylated Derivatives: A general strategy to prevent amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (33), 25109-25115.
- 168.Sciarretta, K. L.; Boire, A.; Gordon, D. J.; Meredith, S. C., Spatial Separation of β -Sheet Domains of β -Amyloid: Disruption of Each β -Sheet by N-Methyl Amino Acids†. *Biochemistry* **2006**, *45* (31), 9485-9495.
- 169.Kokkoni, N.; Stott, K.; Amijee, H.; Mason, J. M.; Doig, A. J., N-Methylated Peptide Inhibitors of β -Amyloid Aggregation and Toxicity. Optimization of the Inhibitor Structure†. *Biochemistry* **2006**, *45* (32), 9906-9918.
- 170.Gordon, D. J.; Meredith, S. C., Probing the Role of Backbone Hydrogen Bonding in β -Amyloid Fibrils with Inhibitor Peptides Containing Ester Bonds at Alternate Positions. *Biochemistry* **2002**, *42* (2), 475-485.

171. Ghanta, J.; Shen, C. L.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M., A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity. *J Biol Chem* **1996**, 271 (47), 29525-8.
172. Pallitto, M. M.; Ghanta, J.; Heinzelman, P.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M., Recognition Sequence Design for Peptidyl Modulators of β -Amyloid Aggregation and Toxicity[†]. *Biochemistry* **1999**, 38 (12), 3570-3578.
173. Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M., Structure-function relationships for inhibitors of β -amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF. *Biochemistry* **2001**, 40 (26), 7882-7889.
174. Etienne, M. A.; Aucoin, J. P.; Fu, Y.; McCarley, R. L.; Hammer, R. P., Stoichiometric Inhibition of Amyloid β -Protein Aggregation with Peptides Containing Alternating α,α -Disubstituted Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (11), 3522-3523.
175. Li, Q.; Gordon, M.; Etienne, M. A.; Hammer, R. P.; Morgan, D., Contrasting In Vivo Effects of Two Peptide-Based Amyloid-Protein Aggregation Inhibitors in a Transgenic Mouse Model of Amyloid Deposition. *Cell Transplant.* **2008**, 17 (4), 397-408.
176. Bett, C. K.; Ngunjiri, J. N.; Serem, W. K.; Fontenot, K. R.; Hammer, R. P.; McCarley, R. L.; Garno, J. C., Structure-Activity Relationships in Peptide Modulators of β -Amyloid Protein Aggregation: Variation in α,α -Disubstitution Results in Altered Aggregate Size and Morphology. *ACS Chem Neurosci* **2010**, 1 (9), 608-626.
177. Bett, C. K.; Serem, W. K.; Fontenot, K. R.; Hammer, R. P.; Garno, J. C., Effects of Peptides Derived from Terminal Modifications of the A β Central Hydrophobic Core on A β Fibrillization. *ACS Chem Neurosci* **2010**, 1 (10), 661-678.
178. Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamin, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J.-J.; Chin, J.; Kelley, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M., Modified-Peptide Inhibitors of Amyloid β -Peptide Polymerization. *Biochemistry* **1999**, 38 (21), 6791-6800.
179. Wei, C.-W.; Peng, Y.; Zhang, L.; Huang, Q.; Cheng, M.; Liu, Y.-N.; Li, J., Synthesis and evaluation of ferrocenoyl pentapeptide (Fc-KLVFF) as an inhibitor of Alzheimer's A β ₁₋₄₂ fibril formation in vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (19), 5818-5821.
180. Zhang, L.; Yagnik, G.; Peng, Y.; Wang, J.; Howard Xu, H.; Hao, Y.; Liu, Y.-N.; Zhou, F., Kinetic Studies of Inhibition of the A β (1-42) Aggregation Using a Ferrocene-tagged β -Sheet Breaker Peptide. *Anal. Biochem.* **2012**.
181. Hochdörffer, K.; März-Berberich, J.; Nagel-Steger, L.; Epple, M.; Meyer-Zaika, W.; Horn, A. H. C.; Sticht, H.; Sinha, S.; Bitan, G.; Schrader, T., Rational Design of β -Sheet Ligands Against A β ₄₂-Induced Toxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (12), 4348-4358.
182. Sievers, S. A.; Karanickolas, J.; Chang, H. W.; Zhao, A.; Jiang, L.; Zirafi, O.; Stevens, J. T.; Munch, J.; Baker, D.; Eisenberg, D., Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* **2011**, 475 (7354), 96-100.
183. Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S., Macrocyclic β -Sheet Peptides That Inhibit the Aggregation of a Tau-Protein-Derived Hexapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (9), 3144-3157.
184. Masuda, M.; Suzuki, N.; Taniguchi, S.; Oikawa, T.; Nonaka, T.; Iwatsubo, T.; Hisanaga, S.-i.; Goedert, M.; Hasegawa, M., Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochemistry* **2006**, 45 (19), 6085-6094.
185. Lorenzo, A.; Yankner, B. A., β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91 (25), 12243-12247.

186. Buell, A. K.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P.; Welland, M. E., Interactions between amyloidophilic dyes and their relevance to studies of amyloid inhibitors. *Biophys. J.* **2010**, *99* (10), 3492-3497.
187. Grelle, G.; Otto, A.; Lorenz, M.; Frank, R. F.; Wanker, E. E.; Bieschke, J., Black tea theaflavins inhibit formation of toxic amyloid- β and α -synuclein fibrils. *Biochemistry* **2011**, *50* (49), 10624-10636.
188. Hawkes, C. A.; Ng, V.; McLaurin, J., Small molecule inhibitors of A β -aggregation and neurotoxicity. *Drug Dev. Res.* **2009**, *70* (2), 111-124.
189. Taniguchi, S.; Suzuki, N.; Masuda, M.; Hisanaga, S.-i.; Iwatsubo, T.; Goedert, M.; Hasegawa, M., Inhibition of Heparin-induced Tau Filament Formation by Phenothiazines, Polyphenols, and Porphyrins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (9), 7614-7623.
190. Wong, H. E.; Qi, W.; Choi, H.-M.; Fernandez, E. J.; Kwon, I., A safe, blood-brain barrier permeable triphenylmethane dye inhibits amyloid- β neurotoxicity by generating nontoxic aggregates. *ACS Chem Neurosci* **2011**, *2* (11), 645-657.
191. Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E., Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem. Biol. Drug Des.* **2005**, *67* (1), 27-37.
192. Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M., Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75* (6), 742-750.
193. Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kayed, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A., Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (7), 5892-5901.
194. Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M., Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63* (13), 1538-1552.
195. Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B., Curcumin-Derived Pyrazoles and Isoxazoles: Swiss Army Knives or Blunt Tools for Alzheimer's Disease? *ChemMedChem* **2008**, *3* (1), 165-172.
196. Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M., Review: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* **2010**, *16* (5), 285-297.
197. Necula, M.; Kaye, R.; Milton, S.; Glabe, C. G., Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid β oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (14), 10311-10324.
198. Garcia-Alloza, M.; Borrelli, L.; Rozkalne, A.; Hyman, B.; Bacskai, B., Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.* **2007**, *102* (4), 1095-1104.
199. Walsh, D. M.; Townsend, M.; Podlisny, M. B.; Shankar, G. M.; Fadeeva, J. V.; El Agnaf, O.; Hartley, D. M.; Selkoe, D. J., Certain inhibitors of synthetic amyloid β -peptide (A β) fibrillogenesis block oligomerization of natural A β and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (10), 2455-2462.
200. Ehrnhoefer, D. E.; Bieschke, J.; Boeddrich, A.; Herbst, M.; Masino, L.; Lurz, R.; Engemann, S.; Pastore, A.; Wanker, E. E., EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (6), 558-566.
201. Hamaguchi, T.; Ono, K.; Murase, A.; Yamada, M., Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175* (6), 2557-2565.

202. Ono, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2003**, *87* (1), 172-181.
203. Bieschke, J.; Herbst, M.; Wiglenda, T.; Friedrich, R. P.; Boeddrich, A.; Schiele, F.; Kleckers, D.; del Amo, J. M. L.; Grüning, B. A.; Wang, Q., Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nat. Chem. Biol.* **2011**.
204. Ladiwala, A. R. A.; Lin, J. C.; Bale, S. S.; Marcelino-Cruz, A. M.; Bhattacharya, M.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M., Resveratrol Selectively Remodels Soluble Oligomers and Fibrils of Amyloid A β into Off-pathway Conformers. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (31), 24228-24237.
205. Necula, M.; Breydo, L.; Milton, S.; Kaye, R.; van der Veer, W. E.; Tone, P.; Glabe, C. G., Methylene blue inhibits amyloid A β oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry* **2007**, *46* (30), 8850-8860.
206. Ladiwala, A. R. A.; Dordick, J. S.; Tessier, P. M., Aromatic Small Molecules Remodel Toxic Soluble Oligomers of Amyloid β through Three Independent Pathways. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (5), 3209-3218.
207. Härd, T.; Lendel, C., Inhibition of Amyloid Formation. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421* (4-5), 441-465.
208. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* **2010**, *59* (4-5), 276-289.
209. Brunden, K. R.; Ballatore, C.; Crowe, A.; Smith, A. B.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q., Tau-directed drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies: a focus on tau assembly inhibitors. *Exp. Neurol.* **2010**, *223* (2), 304-310.
210. Wischik, C. M.; Edwards, P. C.; Lai, R. Y.; Roth, M.; Harrington, C. R., Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (20), 11213-11218.
211. Pickhardt, M.; Gazova, Z.; von Bergen, M.; Khlistunova, I.; Wang, Y.; Hascher, A.; Mandelkow, E.-M.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer's Paired Helical Filaments in Vitro and in Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (5), 3628-3635.
212. Chirita, C.; Necula, M.; Kuret, J., Ligand-Dependent Inhibition and Reversal of Tau Filament Formation[†]. *Biochemistry* **2004**, *43* (10), 2879-2887.
213. Necula, M.; Chirita, C. N.; Kuret, J., Cyanine Dye N744 Inhibits Tau Fibrillization by Blocking Filament Extension: Implications for the Treatment of Tauopathic Neurodegenerative Diseases[†]. *Biochemistry* **2005**, *44* (30), 10227-10237.
214. Congdon, E. E.; Necula, M.; Blackstone, R. D.; Kuret, J., Potency of a tau fibrillization inhibitor is influenced by its aggregation state. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *465* (1), 127-135.
215. Honson, N. S.; Jensen, J. R.; Darby, M. V.; Kuret, J., Potent inhibition of tau fibrillization with a multivalent ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *363* (1), 229-234.
216. Crowe, A.; Ballatore, C.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y., High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358* (1), 1-6.
217. Crowe, A.; Huang, W.; Ballatore, C.; Johnson, R. L.; Hogan, A.-M. L.; Huang, R.; Wichterle, J.; McCoy, J.; Huryn, D.; Auld, D. S.; Smith, A. B.; Inglese, J.; Trojanowski, J. Q.; Austin, C. P.; Brunden, K. R.; Lee, V. M. Y., Identification of Aminothienopyridazine Inhibitors of Tau Assembly by Quantitative High-Throughput Screening. *Biochemistry* **2009**, *48* (32), 7732-7745.

218. Ballatore, C.; Brunden, K. R.; Piscitelli, F.; James, M. J.; Crowe, A.; Yao, Y.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Smith, A. B., Discovery of Brain-Penetrant, Orally Bioavailable Amino-thienopyridazine Inhibitors of Tau Aggregation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (9), 3739-3747.
219. Ballatore, C.; Crowe, A.; Piscitelli, F.; James, M.; Lou, K.; Rossidivito, G.; Yao, Y.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Brunden, K. R.; Smith, A. B., Amino-thienopyridazine inhibitors of tau aggregation: Evaluation of structure-activity relationship leads to selection of candidates with desirable in vivo properties. *Biorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (14), 4451-4461.
220. Gregor, L.; Marcus, P.; David, G. L.; Boris, S.; Eckhard, M., Screening for Inhibitors of Tau Protein Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments: A Ligand Based Approach Results in Successful Scaffold Hopping. *Curr Alzheimer Res* **2007**, *4* (3), 315-323.
221. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Khlistunova, I.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Waldmann, H., Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Angew. Chem.* **2007**, *119* (48), 9375-9379.
222. Pickhardt, M.; Larbig, G.; Khlistunova, I.; Coksezen, A.; Meyer, B.; Mandelkow, E.-M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E., Phenylthiazolyl-Hydrazide and Its Derivatives Are Potent Inhibitors of τ Aggregation and Toxicity in Vitro and in Cells†. *Biochemistry* **2007**, *46* (35), 10016-10023.
223. Khlistunova, I.; Biernat, J.; Wang, Y.; Pickhardt, M.; von Bergen, M.; Gazova, Z.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.-M., Inducible Expression of Tau Repeat Domain in Cell Models of Tauopathy: Aggregation is toxic to cells but be reversed by inhibitors drugs *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (2), 1205-1214.
224. Pickhardt, M.; Biernat, J.; Khlistunova, I.; Wang, Y. P.; Gazova, Z.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., N-Phenylamine Derivatives as Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Curr Alzheimer Res* **2007**, *4* (4), 397-402.
225. May, B. C.; Fafarman, A. T.; Hong, S. B.; Rogers, M.; Deady, L. W.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E., Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (6), 3416-3421.
226. Chafekar, S. M.; Malda, H.; Merckx, M.; Meijer, E. W.; Viertl, D.; Lashuel, H. A.; Baas, F.; Scheper, W., Branched KLVFF Tetramers Strongly Potentiate Inhibition of β -Amyloid Aggregation. *ChemBioChem* **2007**, *8* (15), 1857-1864.
227. (a) Gellerman, G.; Hazan, E.; Brider, T.; Traube, T.; Albeck, A.; Shatzmiller, S., Facile Synthesis of Orthogonally Protected Optically Pure Keto-and Diketopiperazine Building Blocks for Combinatorial Chemistry. *Int J Pept Res Ther* **2008**, *14* (2), 183-192; (b) Gellerman, G.; Hazan, E.; Kovaliov, M.; Albeck, A.; Shatzmiller, S., Synthesis of orthogonally protected optically pure ketopiperazine, diketopiperazine, ketodiazepane, and 3-aminopyrrolidone building blocks for peptidomimetic combinatorial chemistry. *Tetrahedron* **2009**, *65* (7), 1389-1396.
228. Kan, T.; Fukuyama, T., New strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun.* **2003**, (4), 353-359.
229. Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C.-K.; Hidai, Y.; Kan, T., 2, 4-Dinitrobenzenesulfonamides: A simple and practical method for the preparation of a variety of secondary amines and diamines. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (33), 5831-5834.
230. Demmer, O.; Dijkgraaf, I.; Schottelius, M.; Wester, H.-J.; Kessler, H., Introduction of functional groups into peptides via N-alkylation. *Org. Lett.* **2008**, *10* (10), 2015-2018.
231. (a) Jencks, W. P., Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation1. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (2), 475-481; (b) Rose, K., Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (1), 30-33.

- 232.Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523-7526.
- 233.Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P., 1-Ethoxyethylidene, a new group for the stepwise SPPS of aminooxyacetic acid containing peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 983-991.
- 234.Huisgen, R., Kinetics and mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (11), 633-645.
- 235.(a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.* **2002**, *114* (14), 2708-2711; (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase:[1,2,3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
- 236.(a) Angell, Y. L.; Burgess, K., Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (10), 1674-1689; (b) Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952-3015.
- 237.Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8794-8804.
- 238.Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (52), 9879-9883.
- 239.Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P., Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (35), 8051-8056.
- 240.Meyer, K. G., Simple Preparation of Monoalkylhydrazines. *Synlett* **2004**, *2004* (EFirst), 2355-2356.
- 241.Shi, W.; Dolai, S.; Rizk, S.; Hussain, A.; Tariq, H.; Averick, S.; L'Amoreaux, W.; El Idrissi, A.; Banerjee, P.; Raja, K., Synthesis of monofunctional curcumin derivatives, clicked curcumin dimer, and a PAMAM dendrimer curcumin conjugate for therapeutic applications. *Org. Lett.* **2007**, *9* (26), 5461-5464.
- 242.Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797-3800.
- 243.Nyffeler, P. T.; Liang, C.-H.; Koeller, K. M.; Wong, C.-H., The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (36), 10773-10778.
- 244.Gamblin, T. C.; King, M. E.; Dawson, H.; Vitek, M. P.; Kuret, J.; Berry, R. W.; Binder, L. I., In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants. *Biochemistry* **2000**, *39* (20), 6136-6144.
- 245.Shearman, M. S.; Ragan, C. I.; Iversen, L. L., Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91* (4), 1470-1474.
- 246.Herholz, K.; Ebmeier, K., Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **2011**, *10* (7), 667-670.
- 247.Shin, J.; Kepe, V.; Barrio, J. R.; Small, G. W., The Merits of FDDNP-PET Imaging in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *26*, 135-145.

- 248.Fodero-Tavoletti, M. T.; Okamura, N.; Furumoto, S.; Mulligan, R. S.; Connor, A. R.; McLean, C. A.; Cao, D.; Rigopoulos, A.; Cartwright, G. A.; O'Keefe, G., 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* **2011**, *134* (4), 1089-1100.
- 249.Zhang, W.; Arteaga, J.; Cashion, D. K.; Chen, G.; Gangadharmath, U.; Gomez, L. F.; Kasi, D.; Lam, C.; Liang, Q.; Liu, C., A Highly Selective and Specific PET Tracer for Imaging of Tau Pathologies. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**.
- 250.McGowan, E.; Eriksen, J.; Hutton, M., A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.* **2006**, *22* (5), 281-289.
- 251.Duyckaerts, C.; Potier, M.-C.; Delatour, B., Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol. (Berl)*. **2008**, *115* (1), 5-38.
- 252.Oddo, S.; Caccamo, A.; Kitazawa, M.; Tseng, B. P.; LaFerla, F. M., Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24* (8), 1063-1070.
- 253.(a) Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; August Schubiger, P.; Herrmann, W. A.; Artus, G.; Abram, U.; Kaden, T. A., Metal carbonyl syntheses XXII. Low-pressure carbonylation of [MOC14]⁻ and [MO4]⁻. The technetium (I) and rhenium (I) complexes [NEt 4]²⁺[MCl 3(CO) 3]. *J. Organomet. Chem.* **1995**, *492* (2), 217-224; (b) Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, A. P.; Abram, U.; Kaden, T. A., A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of [Tc-99m (OH₂)(3)(CO)(3)]⁺ from [(TcO₄)-Tc-99m]⁻ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (31), 7987-7988.
- 254.Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finner, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli, A.; Abram, U.; Mach, J.-P.; Plückthun, A., Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc (I)-carbonyl complex. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 897-901.
- 255.Egli, A.; Alberto, R.; Tannahill, L.; Schibli, R.; Abram, U.; Schaffland, A.; Waibel, R.; Tourwé, D.; Jeannin, L.; Iterbeke, K., Organometallic 99mTc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40* (11), 1913.
- 256.King, M. E.; Ahuja, V.; Binder, L. I.; Kuret, J., Ligand-dependent tau filament formation: implications for Alzheimer's disease progression. *Biochemistry* **1999**, *38* (45), 14851-14859.
- 257.Elbaum-Garfinkle, S.; Rhoades, E., Identification of an Aggregation-Prone Structure of Tau. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (40), 16607-16613.
- 258.Sibille, N.; Sillen, A.; Leroy, A.; Wieruszeski, J.-M.; Mulloy, B.; Landrieu, I.; Lippens, G., Structural Impact of Heparin Binding to Full-Length Tau As Studied by NMR Spectroscopy†. *Biochemistry* **2006**, *45* (41), 12560-12572.
- 259.Andronesi, O. C.; Bergen, M. v.; Biernat, J.; Seidel, K.; Griesinger, C.; Mandelkow, E.; Baldus, M., Characterization of Alzheimer's-like Paired Helical Filaments from the Core Domain of Tau Protein Using Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (18), 5922-5928.
- 260.Daebel, V.; Chinnathambi, S.; Biernat, J.; Schwalbe, M.; Habenstein, B.; Loquet, A.; Akoury, E.; Tepper, K.; Müller, H.; Baldus, M.; Griesinger, C.; Zweckstetter, M.; Mandelkow, E.; Vijayan, V.; Lange, A., β -Sheet Core of Tau Paired Helical Filaments Revealed by Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (34), 13982-13989.
- 261.(a) Liang, Y.; Lynn, D. G.; Berland, K. M., Direct observation of nucleation and growth in amyloid self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (18), 6306-6308; (b) Mehta, A. K.; Lu, K.; Childers, W. S.; Liang, Y.; Dublin, S. N.; Dong, J.; Snyder, J. P.; Pingali, S. V.; Thiyagarajan, P.; Lynn, D. G., Facial symmetry in protein self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (30), 9829-9835.

- 262.(a) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D., Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **2005**, *435* (7043), 773-778; (b) Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J.; McFarlane, H. T., Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* **2007**, *447* (7143), 453-457.
- 263.Goux, W. J.; Kopplin, L.; Nguyen, A. D.; Leak, K.; Rutkowsky, M.; Shanmuganandam, V. D.; Sharma, D.; Inouye, H.; Kirschner, D. A., The Formation of Straight and Twisted Filaments from Short Tau Peptides. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (26), 26868-26875.
- 264.Barghorn, S.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments in vitro. *Methods Mol. Biol* **2005**, *299*, 35-51.
- 265.Csokova, N.; Skrabana, R.; Liebig, H.-D.; Mederlyova, A.; Kontsek, P.; Novak, M., Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Expression Purif.* **2004**, *35* (2), 366-372.
- 266.Fulmer, G. R.; Miller, A. J.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I., NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176-2179.